

Der ER-Stress-Signalweg und seine Assoziation  
mit Entzündung und Apoptose im Skelettmuskel  
bei peritonealer Sepsis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Uta Barbara Metzing, geb. Schaller  
geboren am 06.12.1989 in Borna

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. rer. nat. Ralf A. Claus, Universitätsklinikum Jena
2. PD Dr. rer. nat. Christian Kosan, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. med. Andreas Birkenfeld, Universitätsklinikum Dresden

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 02. Juli 2019

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis  | VI        |
| Einheitenverzeichnis   | VIII      |
| Zusammenfassung  | IX        |
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Sepsis und sepsisbedingte Schädigung von Muskelgewebe        | 2         |
| 1.1.1 Sepsis   | 2         |
| 1.1.2 Sepsisbedingte Schädigung von Muskelgewebe                 | 4         |
| 1.2 Endoplasmatisches Retikulum und ER-Stress-Signalweg          | 7         |
| 1.2.1 Endoplasmatisches Retikulum                                | 7         |
| 1.2.2 ER-Stress und die <i>Unfolded Protein Response</i>         | 8         |
| 1.2.2.1 Steuerung der <i>Unfolded Protein Response</i>           | 9         |
| 1.2.2.2 Klinische Bedeutung der <i>Unfolded Protein Response</i> | 14        |
| <b>2 Ziele der Arbeit</b>  | <b>16</b> |
| <b>3 Material und Methoden</b>                                   | <b>17</b> |
| 3.1 Studiendesign  | 17        |
| 3.2 Einschluss von Patienten und Aufklärung                      | 17        |
| 3.3 Probensammlung   | 19        |
| 3.3.1 INSIGHT-Studie   | 19        |
| 3.3.2 Tiermodell   | 19        |
| 3.4 Blutentnahme und klinisch-chemische Untersuchungen           | 20        |
| 3.5 Molekularbiologische Methoden                                | 21        |
| 3.5.1 RNA-Isolation aus humanem Skelettmuskel                    | 21        |
| 3.5.2 RNA-Isolation aus murinem Skelettmuskel                    | 22        |
| 3.5.3 RNA-Konzentrationsbestimmung und Eindampfen                | 22        |
| 3.5.4 RNA-Qualitätskontrolle                                     | 23        |
| 3.5.5 cDNA-Synthese  | 24        |
| 3.5.6 Primerdesign und -etablierung                              | 24        |
| 3.5.7 Durchführung der qRT-PCR-Reaktion                          | 28        |
| 3.5.8 Genexpressionsanalyse                                      | 28        |
| 3.6 Histologische Untersuchungen                                 | 29        |
| 3.6.1 Vorbereitung der Muskelproben für die Histologie           | 29        |

## Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.6.2    | Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....  | 30        |
| 3.6.3    | Immunhistochemische Färbung von CD68.....  | 31        |
| 3.6.4    | Immunhistochemische Färbung von XBP1 .....   | 31        |
| 3.6.5    | TUNEL-Färbung .....  | 32        |
| 3.6.6    | Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von CHOP und CASP12 .....   | 33        |
| 3.6.7    | Auswertung der histologischen Färbungen .....  | 33        |
| 3.7      | Statistische Auswertung .....  | 36        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse.....</b>   | <b>38</b> |
| 4.1      | Studienpopulation der INSIGHT-Studie .....   | 38        |
| 4.2      | Konfirmatorisches Tiermodell .....   | 41        |
| 4.3      | Muskelinflammation .....   | 42        |
| 4.3.1    | Genexpressionsraten in humanem und murinem Skelettmuskel.....  | 42        |
| 4.3.2    | Immunhistochemische Färbung von CD68 in humanem Skelettmuskel ..   | 44        |
| 4.4      | ER-Stress-Signalweg .....  | 46        |
| 4.4.1    | Genexpressionsraten in humanen und murinen Skelettmuskel.....  | 46        |
| 4.4.2    | XBP1-Färbung in humanem und murinem Skelettmuskel .....  | 50        |
| 4.5      | Induktion von Apoptose .....   | 51        |
| 4.5.1    | Genexpressionsraten in humanen und murinen Skelettmuskel.....  | 51        |
| 4.5.2    | TUNEL-Färbung in humanem Skelettmuskel .....   | 53        |
| 4.5.3    | TUNEL-Färbung in murinem Skelettmuskel .....   | 55        |
| 4.5.4    | Färbung von CHOP und CASP12 in humanem Skelettmuskel .....   | 56        |
| 4.6      | Klinische Assoziationen .....  | 57        |
| 4.6.1    | Assoziation humaner CD68-Genexpressionsrate mit der CD68-Färbung<br>und anderen untersuchten Zielgenen ..... | 59        |
| 4.6.2    | Assoziation der CD68-Immunhistochemie mit der Sterblichkeit in der<br>Sepsisgruppe .....                     | 60        |
| 4.6.3    | Genexpressionsrate von GLUT4 in humanem Skelettmuskel .....  | 62        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>64</b> |
| 5.1      | Studiendesign und Eignung der ausgewählten Methoden .....  | 64        |
| 5.2      | Vergleichbarkeit des humanen Studienkollektives mit dem Mausmodell der<br>peritonealen Sepsis.....           | 66        |
| 5.3      | Erhöhte Inflammation im Skelettmuskel bei peritonealer Sepsis .....  | 68        |
| 5.4      | Nachweis der <i>Unfolded Protein Response</i> im septischen Skelettmuskel .....                              | 70        |

## Inhaltsverzeichnis

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 5.5       | <i>Unfolded Protein Response</i> und die Aktivierung pro-apoptotischer<br>Signalwege .....                | 73         |
| 5.6       | <i>Unfolded Protein Response</i> und ihre Assoziation mit sepsisbedingter<br>Muskelgewebsschädigung ..... | 80         |
| <b>6</b>  | <b>Schlussfolgerung</b> .....   | <b>84</b>  |
| <b>7</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b> .....   | <b>86</b>  |
| <b>8</b>  | <b>Anhang</b> .....   | <b>97</b>  |
| 8.1       | Anamnesebogen INSIGHT-Studie .....  | 97         |
| <b>9</b>  | <b>Danksagung</b> .....   | <b>101</b> |
| <b>10</b> | <b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....   | <b>102</b> |

**Abkürzungsverzeichnis**

|                  |  |
|------------------|--|
| Abb.             | Abbildung  |
| ACTB             | beta-Actin   |
| ADA              | <i>American Diabetes Association</i>                                 |
| ANOVA            | <i>Analysis of Variance</i>  |
| APACHE II        | <i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II</i>             |
| ARDS             | <i>acute respiratory distress syndrome</i>                           |
| ASK1             | <i>apoptosis signal regulating factor 1</i>                          |
| ATF4             | <i>activating transcription factor 4</i>                             |
| ATF6             | <i>activating transcription factor 6</i>                             |
| ATF6f            | fragmentiertes ATF6  |
| BAK              | <i>Bcl-2 homologous antagonist killer, Apoptoseregulator</i>         |
| BAX              | <i>bcl-2 associated X protein, Apoptoseregulator</i>                 |
| bcl-2            | <i>B-cell-lymphoma-2</i>   |
| BiP/GRP78        | <i>binding immunoglobulin protein / glucose-regulated protein 78</i> |
| BMI              | <i>Body Mass Index</i>   |
| bp.              | Basenpaare   |
| Ca <sup>2+</sup> | Calcium, ionisiert   |
| CASP12           | Caspase 12   |
| CCI              | <i>chronic critically ill</i>  |
| CCL2             | <i>chemokine C-C motif ligand 2</i>                                  |
| CD68             | <i>cluster of differentiation 68</i>                                 |
| cDNA             | codogene DNA   |
| CHOP             | <i>C/EBP homologous protein</i>                                      |
| CIM              | <i>critical illness myopathy</i>                                     |
| CIP              | <i>critical illness polyneuropathy</i>                               |
| CLP              | <i>cecal ligation and puncture</i>                                   |
| CMB              | <i>Center for Molecular Biomedicine</i>                              |
| CRP              | C-reaktives Protein  |
| DNA              | <i>deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure</i>                 |
| eIF2 $\alpha$    | <i>eukaryotic initiation factor 2<math>\alpha</math></i>             |
| ELANE            | Neutrophilen-Elastase  |
| ER               | Endoplasmatisches Retikulum  |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| ERAD              | ER-assoziierte Degradation  |
| ERS               | ER-Stress   |
| ERSE              | <i>ER stress response element</i>   |
| <i>fw</i>         | <i>forward primer</i>   |
| GADD34            | <i>growth arrest and DNA damage-inducible protein 34</i>                  |
| GAPDH             | Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase                                   |
| GRP94             | <i>glucose related protein 94</i>   |
| GLUT4             | Glukosetransporter Typ 4  |
| HbA <sub>1c</sub> | Hämoglobin A1c  |
| HFD               | <i>high fat diet</i>  |
| HMBS              | Hydroxymethylbilan-Synthase   |
| HOMA-IR           | <i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>                 |
| HPRT              | Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase                                     |
| hsp70             | <i>heatshockproteins 70</i> , Hitzeschockproteine 70                      |
| ICU-AW            | <i>intensive care unit acquired weakness</i>                              |
| IL-6              | Interleukin-6   |
| IRE1              | <i>inositol-requiring-enzyme 1</i>  |
| JNK/MAPK8         | c-Jun N-terminale Kinase / mitogen-activated protein kinase 8             |
| KD                | Kontrolldiät  |
| mRNA              | <i>messenger</i> Ribonukleinsäure   |
| MeSy              | Metabolisches Syndrom   |
| MPO               | Myeloperoxidase   |
| NASH              | <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>                                      |
| NF-κB             | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>   |
| PBS               | <i>phosphate buffered saline</i>  |
| PCI               | <i>peritoneal contamination and infection</i>                             |
| PERK              | <i>double-stranded RNA-dependent protein kinase</i>                       |
| PICS              | <i>Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome</i> |
| qRT-PCR           | quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion               |
| RIDD              | <i>regulated IRE1α-dependent decay of mRNA</i>                            |
| ROS               | <i>reactive oxygen spezies</i>  |
| <i>rv</i>         | <i>reverse primer</i>   |
| S1P               | <i>site-1 protease</i>  |

## Abkürzungsverzeichnis

|              |   |
|--------------|---|
| S2P          | <i>site-2 protease</i>  |
| SAPS II      | <i>Simplified Acute Physiology Score</i>                              |
| SEM          | <i>standard error of the mean</i> ; Standardfehler des Mittelwertes   |
| SM           | Skelettmuskel   |
| SOFA         | <i>Sepsis-related Organ Failure Assessment</i>                        |
| T1D          | Typ 1 Diabetes mellitus   |
| T2D          | Typ 2 Diabetes mellitus   |
| TdT          | terminale Desoxyribonukleotidyltransferase                            |
| TNF $\alpha$ | Tumornekrosefaktor-Alpha  |
| TUNEL        | <i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>                     |
| Tab.         | Tabelle   |
| UPR          | <i>Unfolded Protein Response</i> , Antwort auf fehlgefaltete Proteine |
| XBP1s        | <i>X-box binding-protein 1, spliced form</i>                          |
| XBP1u        | <i>X-box binding-protein 1, unspliced form</i>                        |

## Einheitenverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| °C             | Grad Celsius (Temperatur)               |
| g, mg,         | Gramm, Milligramm,                      |
| $\mu$ g, pg    | Mikrogramm, Pikogramm (Masse)           |
| h, min, s      | Stunde, Minute, Sekunde (Zeit)          |
| Hz             | Hertz (Frequenz)                        |
| l, ml, $\mu$ l | Liter, Milliliter, Mikroliter (Volumen) |
| K              | Kelvin (Temperaturdifferenz)            |
| mmol/l         | Millimol pro Liter (Konzentration)      |
| mmHg           | Millimeter Quecksilbersäule             |



### Zusammenfassung

**Hintergrund** Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine dysregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion ausgelöst wird. Die Therapie dieses Krankheitsbildes stellt die behandelnden Ärzte vor große Herausforderungen. Die Sanierung des Infektionsfokus' durch eine adäquate antibiotische Behandlung ist dabei das primäre Ziel der intensivmedizinischen Therapie. Daneben nimmt die Unterstützung der Organfunktion und damit das angestrebte Vermeiden sepsisbedingter Komplikationen einen hohen Stellenwert ein. Eine folgenschwere Komplikation der Sepsis ist die Schädigung der Skelettmuskulatur, in deren Verlauf es zur Beeinträchtigung von Atmung und Bewegung kommen kann. Da diese *critical illness myopathy (CIM)* die Patienten auch nach dem Überleben der akuten Sepsis massiv einschränken kann, ist ihre Pathophysiologie und Therapie Gegenstand intensiver Forschung. Die im Rahmen einer Sepsis auftretende systemische Entzündungsreaktion führt zu Zellstress, der sich in einer erhöhten Konzentration fehlgefalteter Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) äußert. Als Reaktion auf diesen ER-Stress aktiviert die Zelle die *Unfolded Protein Response (UPR)*, syn. ER-Stress-Signalweg), die unter anderem durch Hemmung der Translation primär protektiv auf die Zellhomöostase wirkt, aber auch zur Auslösung pro-apoptotischer Signalwege führen kann. Ob die UPR in der Pathophysiologie der sepsisbedingten Muskelgewebsschädigung eine Rolle spielt, ist bisher nicht untersucht worden.

**Fragestellung und Ziele** Ziel dieser Arbeit ist es, das Auftreten von ER-Stress und die Initiierung der UPR im Muskelgewebe von Patienten mit peritonealer Sepsis zu beschreiben. Außerdem soll überprüft werden, ob der pro-apoptotische Weg der UPR aktiviert wird und ob eine Assoziation dieser Signalwege mit der Entstehung sepsisbedingter Muskelgewebsschädigungen zu erkennen ist.

**Methodik** Zur Überprüfung der Arbeitshypothese wurden vergleichend Proben quergestreifter Skelettmuskulatur von Sepsispatienten und Muskelproben von Mäusen nach Induktion einer peritonealen Sepsis entnommen und untersucht. Dabei erfolgte die Analyse der Gewebsinflammation und der Aktivität der UPR anhand der mRNA-Expression etablierter Marker dieser Signalwege mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion. Zur Beschreibung der UPR wurden dabei unter anderen die Genexpressionen von *activating transcription*

## Zusammenfassung

*factor 4* (ATF4), *activating transcription factor 6* (ATF6) und *X-box binding-protein 1* (XBP1) betrachtet. Auch zur Einschätzung pro-apoptotischer Signalwege wurde die mRNA-Expression von Apoptose-Markern wie *C/EBP homologous protein* (CHOP) und Caspase 12 (CASP12) verwendet. Zusätzlich zu den genomischen Untersuchungen wurden histologische Färbungen im Muskelgewebe ausgewählter Patienten durchgeführt. Die Entzündungsreaktion wurde durch die immunhistochemische Färbung CD68<sup>+</sup>-Makrophagen veranschaulicht; das apoptotische Geschehen mittels einer TUNEL-Färbung und der immunhistochemischen Färbung von CHOP und CASP12. Die Ergebnisse der Sepsispatienten der humanen Studiengruppe wurden mit Ergebnissen nicht-septischer Kontrollpatienten und Diabetes-Patienten verglichen. Labordaten, die aus den Serumproben der Studienpatienten gewonnen wurden, dienten dabei zur Charakterisierung der einzelnen Studiengruppen und zur Ermittlung von Korrelationen mit den erhaltenen mRNA-Expressionsdaten.

**Ergebnisse und Diskussion** Im quergestreiften Skelettmuskel von Patienten mit peritonealer Sepsis und Mäusen des PCI-Modells konnte sowohl eine verstärkte Entzündungsreaktion durch die erhöhte mRNA-Expression und die histologische Anfärbbarkeit von CD68 als auch die Aktivierung der UPR anhand erhöhter mRNA-Expressionen von XBP1u und XBP1s nachgewiesen werden. Während die vermehrte mRNA-Expression des Apoptose-Regulators BAX und die TUNEL-Färbung bei septischen Patienten eine gesteigerte Apoptose in der Muskulatur zeigten, ergab die Betrachtung der Apoptose-Mediatoren CHOP und CASP12 auf mRNA-Ebene keine deutlichen Unterschiede zwischen den Studiengruppen. Die Färbungen von CHOP und CASP12 lieferten hingegen Hinweise für die Assoziation von UPR und beobachteter Apoptose im Skelettmuskel von Sepsispatienten. Die beschriebenen signifikanten Ergebnisse waren im humanen Studienkollektiv und im Mausmodell der peritonealen Sepsis weitreichend vergleichbar.

**Schlussfolgerung** Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen der UPR und der Apoptose im Skelettmuskel von Sepsispatienten dienen. Sie können außerdem einen Beitrag zur Klärung der Pathogenese der *critical illness myopathy* leisten. Ob die Mediatoren der UPR als mögliche Targets zur Therapie der CIM genutzt werden können, sollte in kommenden Studien untersucht werden.

### 1 Einleitung

Sepsis ist ein lebensbedrohliches Krankheitsbild, dessen Diagnose und Therapie große Herausforderungen an die behandelnden Ärzte stellt. Weltweit steigt die Anzahl an Betroffenen stetig an (Singer et al. 2016). An Hand von Daten der letzten 10 Jahre wird die weltweite Inzidenz der Sepsis auf 50 Millionen Erkrankungen geschätzt, mit etwa 5,3 Millionen sepsisbedingten Todesfällen (Fleischmann et al. 2016b). Neben der eigentlichen Erkrankung und ihrer Akuttherapie sind in den letzten Jahren vor allem die Komplikationen der Sepsis und die Folgen nach Abschluss der intensivmedizinischen Therapie in den Fokus von Behandlung und Forschung gerückt (Iwashyna et al. 2010). Eine wichtige und für die betroffenen Patientinnen und Patienten folgenschwere Komplikation der Sepsis ist die Schädigung der quergestreiften Skelettmuskulatur. Obwohl mit dieser Schädigung langwierige Verläufe mit Beeinträchtigung von Atmung und Bewegung in Verbindung stehen, sind die Ursachen der sepsisbedingten Muskelgewebsschädigung noch nicht vollständig verstanden.

Die bei einer Sepsis auftretende systemische Entzündungsreaktion führt auf zellulärer Ebene zu Stress und resultiert in einer Schädigung von Organgeweben wie dem quergestreiften Skelettmuskelgewebe. Dieser Zellstress äußert sich unter anderem in einer erhöhten Konzentration fehlgefalteter Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Khan et al. 2016). Das ER kann den Zellstress mit unterschiedlichen membranständigen Sensoren erkennen und aktiviert einen spezifischen Signaltransduktionsweg, den ER-Stress-Signalweg (Schröder und Kaufman 2005). Der hoch konservierte ER-Stress-Signalweg kann den Stress einerseits durch verbesserte Proteinfaltung, gesteigerten Proteinabbau oder Hemmung der Translation reduzieren (Rutkowski und Kaufman 2004). Hält der Zellstress andererseits länger an, reagiert das ER mit der Auslösung pro-apoptotischer Signalwege, die zur Schädigung des Muskelgewebes führen können (Groenendyk und Michalak 2005).

Muskelgewebsschädigungen wie oben beschrieben sind eine häufige und schwerwiegende Komplikation der Sepsis. In der betroffenen Muskulatur ist bereits frühzeitig im Verlauf der Sepsis eine erhöhte Proteindegradation zu beobachten (Hasselgren et al. 2005, Klaude et al. 2007). Außerdem konnte in unterschiedlichen Studien eine verringerte muskuläre Proteinsynthese nachgewiesen werden, die wie

die Degradation zur Schädigung des Muskels beiträgt (Lang et al. 2007, Vary und Kimball 1992). Da die Aktivierung des ER-Stress-Signalweges sowohl mit verringerter Translation als auch mit erhöhter Proteindegradation einhergeht (Schröder und Kaufman 2005), ist dieser Signaltransduktionsweg ein interessantes Target in der Untersuchung sepsisbedingter Muskelgewebsschädigung.

Die möglichen Assoziationen von Sepsis mit Inflammation der Skelettmuskulatur, der Aktivierung des ER-Stress-Signalweges und mit der daraus resultierenden Muskelgewebsschädigung stehen im Fokus der hier vorgelegten Arbeit.

## **1.1 Sepsis und sepsisbedingte Schädigung von Muskelgewebe**

### **1.1.1 Sepsis**

Sepsis ist laut der dritten internationalen Konsensuskonferenz eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine dysregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion ausgelöst wird (Singer et al. 2016). Zur klinischen Feststellung einer Organdysfunktion wird der *Sepsis-related Organ Failure Assessment* (SOFA)-Score angewendet. Dieser Score umfasst Werte zur klinischen Einschätzung der Atmung, des Herz-Kreislauf-Systems, der Stoffwechselfunktion von Leber und Niere, der Gerinnung und des Bewusstseins des Patienten<sup>1</sup> und kann Werte zwischen 0 und 24 Punkten annehmen (Vincent et al. 1996). Eine Sepsis wird mit einem Anstieg dieses Scores um zwei Punkte diagnostiziert. Die zu Grunde liegende Organdysfunktion ist mit einer Krankenhaussterblichkeit von über 10 % assoziiert (Singer et al. 2016). Ein septischer Schock liegt vor, wenn Patienten anhaltenden Vasopressorbedarf zum Aufrechterhalten eines mittleren arteriellen Drucks von größer 65 mmHg und ein Serumlaktat von größer 2 mmol/l trotz adäquater Volumensubstitution aufweisen. Bei diesen Patienten liegt die Krankenhaussterblichkeit bei 40 % (Singer et al. 2016)

---

<sup>1</sup> Aus Gründen der Lesbarkeit wird weitestgehend die männliche Form verwendet. Sämtliche Bezeichnungen gelten für beide Geschlechter.

## Einleitung

Die Sepsis stellt auf Grund der hohen Komplikationsrate große Herausforderungen an die Intensivtherapie. Zwischen 2007 und 2013 lag die Inzidenz der Sepsis in Deutschland bei 5,7 % und die Sterblichkeit von Patienten mit Sepsis bei 24,3 % bzw. bei Patienten mit septischem Schock bei 58,8 % (Fleischmann et al. 2016a). Die Sepsis umfasst einen sich auf viele Organsysteme auswirkenden Symptomkomplex. Trotz intensiver Forschung konnte bis jetzt keine wirksame kausale Therapie zur Behandlung aller Organschädigungen der betroffenen Patienten gefunden werden (Cohen et al. 2015). Die Therapie der Sepsis erfolgt daher vor allem supportiv, beispielsweise durch die Unterstützung des Kreislaufes mit dem Ziel dem drohenden septischen Schock entgegen zu wirken (Reinhart et al. 2010). Vor dem Hintergrund der aktuell gültigen Kriterien zur Diagnose einer Sepsis (Singer et al. 2016) wird eine neue Leitlinie zur Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis durch die Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. vorbereitet. Diese soll bis zum Ende des Jahres 2018 vorgestellt werden<sup>2</sup>. Trotz Ausschöpfung aller intensivmedizinischer Behandlungsoptionen bleibt die Sterblichkeitsrate von Sepsispatienten sowohl in der akuten Phase der Erkrankung als auch nach Verlassen der Intensivstation höher als bei anderen intensivmedizinisch behandelten Patienten (Quartin 1997, Korošec Jagodič et al. 2006). Die erhöhte Sterblichkeit wird unter anderem durch zahlreiche sepsisbedingte Komplikationen und deren eingeschränkte Therapiemöglichkeiten hervorgerufen. Beispiele dafür sind das Entstehen einer akuten Nierenschädigung (Bagshaw et al. 2009), die Schädigung der Lunge im Rahmen eines *Acute Respiratory Distress Syndroms* (ARDS, Atemnotsyndrom) (Matthay und Zemans 2011), die schon früh auftretende Leberschädigung (Dhainaut et al. 2001), die Störung der Gerinnung und Ausbildung einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (Fourrier et al. 1992) und die Beeinträchtigung des Glukosemetabolismus mit Ausbildung einer Stresshyperglykämie (Leonidou et al. 2008). Außerdem kommt es bei vielen Sepsispatienten zur Schädigung von Muskelgewebe. Diese äußert sich entweder als sepsisbedingte Kardiomyopathie (Rudiger und Singer 2013) oder als Schädigung der quergestreiften Skelettmuskulatur (Callahan und Supinski 2009).

---

<sup>2</sup> <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/anmeldung/1/II/079-001.html>; zuletzt abgerufen am 18.09.2018

### 1.1.2 Sepsisbedingte Schädigung von Muskelgewebe

Sepsispatienten, die von Muskelgewebsschädigungen betroffen sind, zeigen sowohl zu Beginn der intensivmedizinischen Therapie als auch im späteren Verlauf nach Entlassung schwerwiegende Einschränkungen der Motorik und Mobilität. Die Schädigung der quergestreiften Skelettmuskulatur betrifft sowohl die Atem- als auch die Extremitätenmuskulatur und führt während der Behandlung auf der Intensivstation zur erschwerten Entwöhnung vom Respirator (De Jonghe et al. 2002) und verzögerter Mobilisation. In Langzeitbeobachtungen konnte außerdem eine Einschränkung der Mobilität noch mehrere Jahre nach der Entlassung aus dem Krankenhaus festgestellt werden (Hermans et al. 2014, Herridge et al. 2011).

Die Muskelgewebsschädigung, die bei Sepsispatienten auftritt, wird als *critical illness myopathy* (CIM) bezeichnet, während die oft gleichzeitig auftretende Nervenschädigung *critical illness polyneuropathy* (CIP) genannt wird (Latronico und et al. 1996). Der Begriff *intensive care unit acquired weakness* (ICU-AW, auf der Intensivstation erworbene Muskelschwäche) fasst CIM und CIP zu einem Krankheitskomplex zusammen, dessen Diagnose einfacher zu stellen ist (Schweickert und Hall 2007). Schon 1984 konnten Bolton und Kollegen zeigen, dass Sepsis ein Risikofaktor für die Entwicklung der CIM ist (Bolton et al. 1984). Auch Witt und Kollegen stellten in ihrer Arbeit eine Assoziation zwischen systemischer Infektion und ICU-AW fest (Witt et al. 1991). Khan und Kollegen konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass muskuläre Schädigungen bei Patienten mit schwerer Sepsis zeitig auftreten und dass diese meist von CIM und CIP gleichermaßen betroffen sind (Khan et al. 2006). In einer prospektiven Studie mit 95 kritisch kranken Patienten wiesen De Jonghe und Kollegen bei 25 % der untersuchten Patienten das Auftreten von ICU-AW nach (De Jonghe et al. 2002).

Es gibt unterschiedliche Methoden, eine CIM bzw. ICU-AW bei Sepsispatienten zu diagnostizieren (Tabelle 1). Klinisch präsentieren sich diese Patienten mit allgemeinem Schwächegefühl, erschwertem *Weaning* nach mechanischer Beatmung und einer beim kooperativen Patienten feststellbaren Verringerung der Kraftgrade gemessen anhand der Skala des *British Medical Research Council*. Eine alternative Untersuchungsmethode stellt die elektrophysiologische Testung mittels Nerven- und Muskelstimulation dar (Trojaborg 2006). Patienten mit CIM zeigen sowohl bei direkter als auch bei indirekter Muskelstimulation reduzierte Muskel-Aktionspotentiale (Rich

et al. 1997). Weber-Carstens und Kollegen demonstrierten, dass durch direkte Stimulation nicht-erregbare Muskelmembranen schon frühzeitig einen Hinweis auf die Entwicklung einer CIM geben können (Weber-Carstens et al. 2009). Grimm und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass Ultraschall-gestützte Untersuchungen der Muskeltextrur eine sinnvolle Screening-Methode für ICU-AW sind, da sie Muskelgewebsschädigungen schon am vierten Erkrankungstag erkennen können. Diese Methode ist zudem einfach, flächendeckend anwendbar und weniger invasiv als die elektrophysiologische Testung (Grimm et al. 2013). Die definitive Diagnose der CIM gelingt durch Muskelbiopsie. Hier lassen sich unterschiedliche Veränderungen der Muskulatur erkennen. Es kommt zu einer Atrophie von Typ-II-Muskelfibrillen (Bierbrauer et al. 2012) und zu einer Reduktion der schweren Ketten des Myosins (Helliwell et al. 1998). Wollersheim und Kollegen konnten in einer prospektiven Studie bei schwer kranken Patienten zeigen, dass schon am fünften Tag nach Aufnahme auf die Intensivstation die Menge an Myosin durch verminderte Synthese und vermehrte Degradation enorm abgenommen hatte und dass dies zur Entwicklung von ICU-AW beitrug (Wollersheim et al. 2014).

**Tabelle 1:** Unterschiedliche Möglichkeiten der Diagnose der *critical illness myopathy*

| Methode                | Ergebnis bei Vorliegen einer <i>critical illness myopathy</i>  |
|------------------------|--|
| Klinische Untersuchung | Allgemeines Schwächegefühl<br>Kraftgrad-Reduktion nach der Skala des British Medical Council<br>Erschwerte Entwöhnung vom Respirator |
| Elektrophysiologie     | Reduktion der Muskel-Aktionspotentiale   |
| Ultraschall            | Veränderungen der Muskeltextrur laut Heckmatt-Score<br>Zunahme an Faszikulationen  |
| Muskelbiopsie          | Atrophie von Typ-II-Muskelfibrillen<br>Reduktion der schweren Ketten des Myosins   |

Obwohl die Muskelgewebsschädigung im Rahmen der Sepsis ein schwerwiegendes und häufig auftretendes Krankheitsbild ist, sind die Mechanismen, die zu seiner Entstehung beitragen noch nicht vollständig verstanden. Mehrere Risikofaktoren, die zur Entwicklung der CIM beitragen, konnten bereits identifiziert werden (Latronico und Bolton 2011). Bei der Sepsis kommt es durch die dysregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion zur systemischen Inflammation, welche einen Hauptrisikofaktor für die

## Einleitung

Entstehung der CIM darstellt (Weber-Carstens et al. 2010). Auch im Rahmen des ARDS kann das Auftreten der CIM beobachtet werden, hier steht allerdings das erschwerte *Weaning* vom Respirator durch die Schädigung der Atemmuskulatur im Vordergrund (Bercker et al. 2005).

Muskuläre Inflammation trägt entscheidend zur klinisch beobachtbaren Muskelgewebsschädigung bei. Langhans und Kollegen konnten diese Muskelinflammation im Rahmen der CIM zeigen. In Muskelbiopsien von CIM-Patienten war das Akute-Phase-Protein Serum Amyloid A1 im Vergleich zu Kontrollpatienten deutlich erhöht. Auch die Stimulation humaner und muriner Myozyten mit Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) führte zur vermehrten Expression dieses inflammatorischen Proteins (Langhans et al. 2014). Ein anderer Surrogatparameter für Muskelinflammation ist die Infiltration des Gewebes mit Makrophagen. Durch immunhistochemische Färbungen des makrophagenständigen Oberflächenproteins *cluster of differentiation 68* (CD68) lassen sich Makrophageninfiltration und Gewebsinflammation veranschaulichen (Chistiakov et al. 2017, van der Kooij et al. 1997). Puthucheary und Kollegen konnten diese Anreicherung CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in Muskeln kritisch kranker Patienten nachweisen (Puthucheary et al. 2013). Die Makrophagen-Aktivität im entzündeten Gewebe lässt sich außerdem anhand des auf Makrophagen chemotaktisch wirkenden Chemokins *chemokine C-C motif ligand 2* (CCL2) (Carr et al. 1994) nachweisen. Die Aktivität neutrophiler Granulozyten kann durch die Untersuchung der von ihnen gebildeten Enzyme Myeloperoxidase (MPO) und Neutrophilen-Elastase (ELANE) beschrieben werden (Nichols et al. 1971).

Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung der CIM sind Hyperglykämie und Insulinresistenz, die im Rahmen der Sepsis eine häufig auftretende Komplikation darstellen (Weber-Carstens et al. 2010). Die Insulinaufnahme in den Muskel erfolgt durch den Glukosetransporter 4 (GLUT4). GLUT4 ist in der Zelle in perinukleären Vesikeln gespeichert und gelangt Insulin-abhängig nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor (Zisman et al. 2000) oder Insulin-unabhängig durch Muskelkontraktion an die Zellmembran und erlaubt so den Glukose-Einstrom in die Muskelzelle (Lund und Holmant 1995). Weber-Carstens und Kollegen konnten bei Patienten mit CIM zeigen, dass die gestörte Translokation von GLUT4 an die Zellmembran im Mittelpunkt der gestörten Glukoseaufnahme in den Muskel steht.



Auch auf mRNA (*messenger* Ribonukleinsäure)-Ebene wiesen sie eine verminderte Expression von GLUT4 bei von CIM betroffenen Patienten nach. Gesteigerte Muskelaktivität durch elektrophysiologische Stimulation führte bei den Patienten zur verbesserten GLUT4-Translokation und einer verringerten Atrophie der Muskelfasern (Weber-Carstens et al. 2013).

## 1.2 Endoplasmatisches Retikulum und ER-Stress-Signalweg

### 1.2.1 Endoplasmatisches Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Zellorganell, welches in den meisten eukaryotischen Zellen zu finden ist. Die Membranen des ER, die die größte Membranmenge in einer Zelle ausmachen (Griffiths et al. 1984), bilden ein weitläufiges Netzwerk aus Hohlräumen und Gängen und verbinden das Zellorganell mit dem Zellkern.

Man unterscheidet zwei unterschiedliche Varianten des ER: das glatte endoplasmatische Retikulum und das mit Ribosomen besetzte raue endoplasmatische Retikulum (Baumann und Walz 2001). Diese beiden Varianten liegen meist gemeinsam und miteinander verbunden in einer Zelle vor.

Das ER ist in allen eukaryotischen Zellen der Ort der Proteinfaltung (Sano und Reed 2013). Alle sekretorische Proteine durchlaufen dieses Zellorganell auf dem Weg zur äußeren Zellmembran (Schröder und Kaufman 2005) und werden hier durch Faltung und posttranslationale Veränderungen, wie die Asparagin-gekoppelte N-Glykosylierung (Hubbard und Ivatt 1981) oder die Bildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken (Fewell et al. 2001) für den Weitertransport in den Golgi-Apparat vorbereitet. Diese wichtige Aufgabe der Proteinfaltung wird durch spezielle Proteine im ER gewährleistet. Zu diesen sogenannten Chaperonen gehören das aus der Familie der Hitzeschockproteine 70 (*heatshockproteins 70*; hsp70) stammende *binding immunoglobulin protein* (BiP, auch bekannt als *glucose-regulated protein 78*, GRP78) (Munro und Pelham 1986), das *glucose related protein 94* (GRP94) (Marzec et al. 2012) und die Lektin-ähnlichen Chaperone Calnexin (Bergeron et al. 1994), ein Transmembranprotein, und sein im Lumen des ER befindliches Homolog Calreticulin (Michalak et al. 1999).

Diese Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-abhängigen Chaperone (Ma und Hendershot 2004) stabilisieren die Proteine während der Faltung.

Neben der wichtigen Aufgabe der Proteinfaltung und -prozessierung nimmt das ER weitere Funktionen in der Zelle wahr. So spielt es eine zentrale Rolle im  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Zelle, dient als größter  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Berridge 2002) und ist Syntheseort der Fette (Zinser et al. 1991).

### 1.2.2 ER-Stress und die *Unfolded Protein Response*

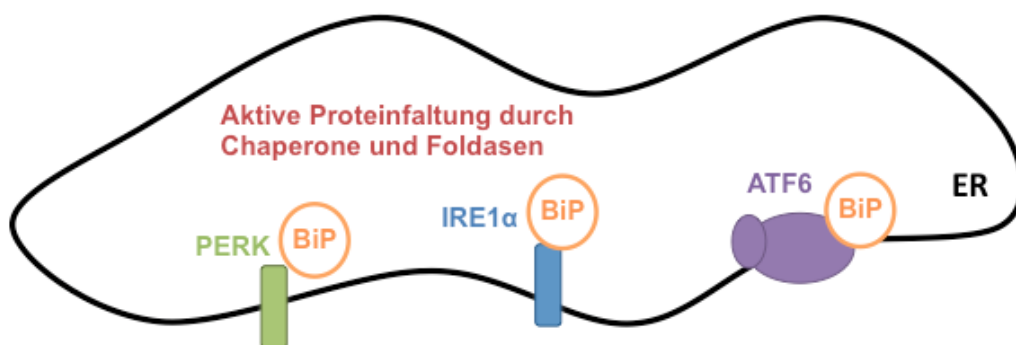
Das ER ist als Ort der Proteinfaltung von zentraler Wichtigkeit für die Homöostase der gesamten Zelle. Eine problemlose Proteinfaltung ist Grundlage für die Funktionsfähigkeit der Zelle.

Unterschiedliche zelluläre Stressmechanismen wie Störungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt, veränderte Protein-Glykosylierung oder Störungen in der Proteinfaltung führen zur Ansammlung ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine im Lumen des ER (Senft und Ronai 2015). Dieser Zustand, der auch durch globale Pathologien wie Trauma (Jian et al. 2008), Sepsis (Ferlito et al. 2014) und Ischämie (Kumar et al. 2001) oder durch pharmakologische Reagenzien wie Tunicamycin oder Brefeldin A (Häcki et al. 2000) ausgelöst werden kann, wird als ER-Stress (ERS) bezeichnet. Im Bestreben, diesem Stress entgegenzuwirken und die Menge fehlgefalteter Proteine abzubauen, reagiert die Zelle auf diesen Stress mit einer hoch konservierten Stressantwort, der sogenannten *Unfolded Protein Response* (UPR, Antwort auf fehlgefaltete Proteine) (Kozutsumi et al. 1988). Das Ziel der UPR ist es, das Gleichgewicht zwischen ungefalteten Proteinen und der Faltungskapazität des ER wieder herzustellen und somit die Zelle in ihrem physiologischen Zustand zu bewahren (Schröder und Kaufman 2005). Dies kann entweder durch Steigerung der Proteinfaltung durch Induktion von im ER lokalisierten Chaperonen (Gething und Sambrook 1992) oder durch Verringerung der Proteinmenge im ER durch Herunterregulation von Transkription (Martinez 2003) und Translation (Harding et al. 1999) oder die Steigerung der ER-assoziierten Degradation (ERAD) (Friedlander et al. 2000) fehlgefalteter Proteine gelingen. Ist die Zelle nicht in der Lage, den ER-Stress zu reduzieren und die Zellhomöostase wieder herzustellen oder hält der ER-Stress über einen längeren Zeitraum an, kann die UPR durch die Induktion des pro-

apoptotischen Transkriptionsfaktors *C/EBP homologous protein* (CHOP) (Nakanishi et al. 2005, Zinszner et al. 1998) und des in Verbindung mit ER-Stress stehenden Apoptosemediators Caspase 12 (CASP12) (Nakagawa et al. 2000) Apoptose und Autophagie auslösen (Rutkowski und Kaufman 2004).

### 1.2.2.1 Steuerung der *Unfolded Protein Response*

Die UPR wird durch drei unterschiedliche im ER lokalisierte Transmembranproteine gesteuert: *inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$*  (IRE1 $\alpha$ ), *double-stranded RNA-dependent protein kinase* (PERK) und *activating transcription factor 6* (ATF6). Befindet sich die Zelle im Zustand der Homöostase und liegt kein ER-Stress vor, ist BiP/GRP78 an die innerhalb des ER-Lumens liegenden Teile dieser Sensoren gebunden. Diese Bindung inaktiviert den Signaltransduktionsweg (Abb. 1) (Bertolotti et al. 2000).



**Abbildung 1: Endoplasmatisches Retikulum im Zustand der Homöostase - modifiziert nach (Flamment et al. 2012, Khan et al. 2016)**

Befinden sich die im endoplasmatischen Retikulum (ER) anfallenden Proteinen und die durch Chaperone und Foldasen stattfindende Faltung im Gleichgewicht, liegt kein ER-Stress vor. BiP bindet und inaktiviert die Stresssensoren IRE1 $\alpha$ , PERK und ATF6. (weitere Erläuterungen im Text)

Kommt es durch einen der oben genannten Auslöser zur massiven Ansammlung ungefalteter Proteine im Lumen des ER, wird ERS ausgelöst. In diesem Zustand der Zelle dissoziiert BiP auf Grund seiner höheren Affinität zu fehlgefalteten Proteinen von den Stresssensoren und erlaubt diesen, die UPR auszulösen (Pincus et al. 2010). Außerdem konnten Gardner und Walter in Hefezellen zeigen, dass fehlgefaltete Proteine auch durch direkte Bindung an IRE1 $\alpha$  die UPR initiieren

können (Gardner und Walter 2011). Im Folgenden werden Struktur und Funktionen der einzelnen ER-Stress-Sensoren im Rahmen der UPR näher erläutert.

**IRE1** ist ein ER-gebundenes Typ-I-Transmembranprotein, das bei Säugetieren in den beiden Isoformen IRE1 $\alpha$  (Tirasophon et al. 1998) und IRE1 $\beta$  (Wang et al. 1998) vorkommt. Tirasophon und Wang konnten unabhängig voneinander zeigen, dass das bei Säugetieren gefundene IRE1 der schon vorher in Hefen bekannten Form IRE1 sehr ähnlich ist. Dies ist ein Zeichen dafür, dass der von IRE1 angesteuerte Signaltransduktionsweg der am längsten konservierte Teil der UPR ist (Cox et al. 1993, Ron und Walter 2007). Während IRE1 $\beta$  hauptsächlich im Darm vorkommt (Bertolotti et al. 2001), ist IRE1 $\alpha$  in allen Zellen vorhanden. Beim vermehrten Anfall fehlgefalteter Proteine im ER dissoziiert BiP von IRE1 $\alpha$  und stimuliert so dessen Oligomerisierung und die Autophosphorylierung der zytosolischen Anteile (Bertolotti et al. 2000). Durch diese Phosphorylierung aktiviertes IRE1 $\alpha$  hat eine Endoribonuklease-Funktion, durch die aus der mRNA des *X-box binding-protein 1* (XBP1u) durch *Splicing* eines 26-Nukleotid-großes Introns die mRNA des potenteren Transkriptionsfaktors *spliced X-box binding-protein 1* (XBP1s) entsteht (Yoshida et al. 2001). Yoshida und Kollegen konnten zeigen, dass es sich bei dem aus der XBP1s-mRNA entstehenden Protein um einen stabilen Transkriptionsfaktor handelt, der im Zellkern die Transkription UPR-relevanter Gene fördert. Die Induktion dieser Transkription erfolgt durch die Bindung von XBP1s an das *ER stress response element* (ERSE) (Yoshida et al. 1998). Unter dem Einfluss von XBP1s werden vermehrt Gene von Chaperonen wie BiP, GRP94 und Calreticulin, Proteinen der ERAD (Oda et al. 2006) und der Fettsynthese transkribiert. Dies führt zur verbesserten Proteinfaltung und zur Degradation fehlgefalteter Proteine. Neben dem *Splicing* der XBP1u-mRNA hat die Aktivierung von IRE1 $\alpha$  weitere Folgen im Rahmen der UPR. Die RNase-Aktivität von IRE1 $\alpha$  kann zur direkten IRE1 $\alpha$ -abhängigen Degradation von mRNA (RIDD, *regulated IRE1 $\alpha$ -dependent decay of mRNA*) aus dem ER führen und somit die Last neuer Proteine auf das ER reduzieren (Hollien und Weissman 2006). Während die beiden oben beschriebenen Funktionen von IRE1 $\alpha$  das Ziel verfolgen, dem ERS entgegen zu wirken und die Zellhomöostase wieder herzustellen, kann IRE1 $\alpha$  bei prolongiertem ER-Stress auch einen pro-apoptotischen Signalweg initiieren. Dazu bindet phosphoryliertes IRE1 $\alpha$  an den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 2 (TRAF2), rekrutiert die *apoptosis signal regulating kinase 1* (ASK1) und führt so zur Phosphorylierung und

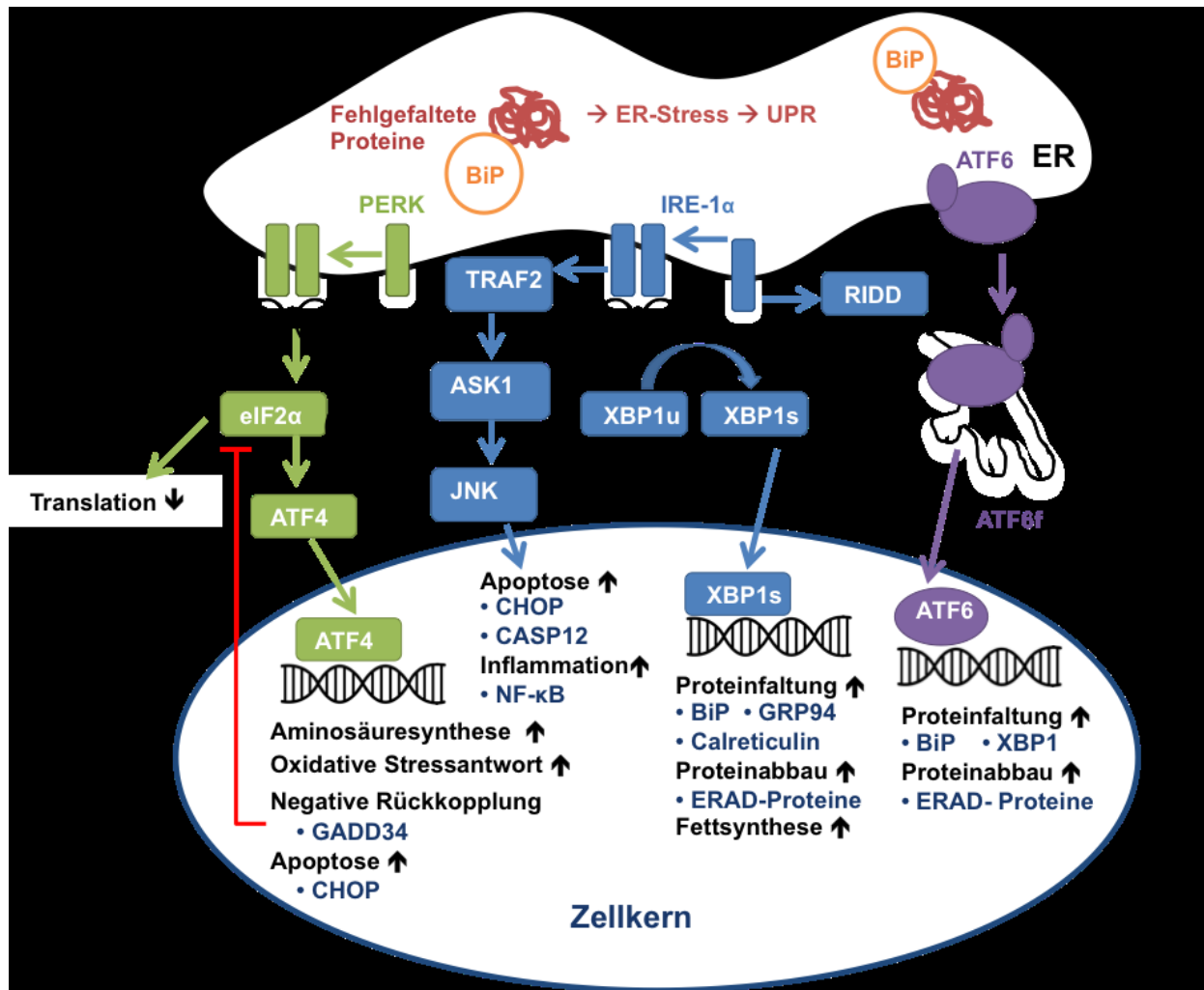
Aktivierung von c-Jun N-terminale Kinase (JNK) (Urano et al. 2000). Die IRE1 $\alpha$ -abhängige Aktivierung von JNK führt wiederum zur vermehrten Transkription des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors CHOP (Szczena-Skorupa et al. 2004). Der IRE1 $\alpha$ /TRAF2-Komplex steht außerdem in Verbindung mit der Aktivierung des Apoptose-Mediators CASP12 (Yoneda et al. 2001). Eine weitere Verknüpfung der UPR mit pro-apoptotischen Signalwegen stellt die Aktivierung von IRE1 $\alpha$  durch das pro-apoptotische *bcl-2 associated X protein* (BAX) dar (Hetz et al. 2006).

Wie IRE1 ist auch **PERK** ein Typ-I-Transmembranprotein, dessen im ER befindlicher Anteil als Sensor für ER-Stress fungiert und dessen zytosolischer Teil Kinase-Aktivität besitzt. Kommt es zur Ansammlung fehlgefalteter Proteine im ER, dissoziiert BiP von PERK und erlaubt die Oligomerisierung und Transphosphorylierung (Bertolotti et al. 2000) des Stresssensors. Aktiviertes PERK phosphoryliert den *eukaryotic translation initiation factor 2* an seiner  $\alpha$ -Untereinheit (eIF2 $\alpha$ ). Phosphoryliertes eIF2 $\alpha$  hemmt einerseits die Translation der meisten Proteine und führt damit zur Reduktion deren Last auf die Faltungsmechanismen des ER (Harding et al. 1999), andererseits ist diese Phosphorylierung Voraussetzung für die Translation bestimmter mit der UPR in Verbindung stehender Proteine, wie dem *activating transcription factor 4* (ATF4). ATF4 ist ein bedeutender Transkriptionsfaktor, der die Transkription UPR-relevanter Gene fördert (Harding et al. 2000), die zur Wiederherstellung der Zellhomöostase beitragen sollen (Scheuner et al. 2001). Neben diesen UPR-Genen, die zum Beispiel die Aminosäuresynthese und die oxidative Stressantwort fördern (Harding et al. 2003), stimuliert ATF4 bei prolongiertem ERS die Transkription von CHOP (Palam et al. 2011, Zinszner et al. 1998) und ermöglicht so den Wechsel der UPR von einem eher protektiven zu einem pro-apoptotischen Signalweg (Szegezdi et al. 2006). Die Aktivität von CHOP kann zu Beginn der UPR durch unterschiedliche Faktoren gehemmt werden (Chitnis et al. 2012), sodass erst lang andauernder ERS zur Apoptose führt (Rutkowski et al. 2006). Sind Zellen chronischem Stress ausgesetzt, konnte gezeigt werden, dass ATF4 und CHOP gemeinsam Apoptose induzieren, indem sie die Proteinsynthese und damit die Menge fehlgefalteter Proteine erhöhen und damit den ERS-bedingten Zelltod fördern (Han et al. 2013). Im Gegensatz zur Aktivierung dieses pro-apoptotischen Signalweges steht die Aktivierung des *growth arrest and DNA damage-inducible protein 34* (GADD34) durch ATF4. Die Expression von GADD34 dient als negativer Rückkopplungsmechanismus für das PERK-Signal (Ma und

Hendershot 2003). Die Aktivierung von GADD34 führt zur Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$  und beendet so den durch PERK gesteuerten Teil der UPR (Novoa et al. 2001, Jousse et al. 2003). Ito und Kollegen konnten zeigen, dass die Aktivität von GADD34 im Mausmodell die apoptosebedingte Leberzellschädigung inhibiert und somit zellprotektiv wirkt (Ito et al. 2016).

**ATF6** ist ein Typ-II-Transmembranprotein, das durch die beiden Gene ATF6 $\alpha$  und ATF6 $\beta$  codiert wird (Haze et al. 1999) und dessen luminaler Anteil als Sensor für ERS dient. Liegt ERS vor, löst sich BiP von ATF6 und dieses wird aktiviert (Shen et al. 2002). Aktiviertes ATF6 gelangt durch vesikalen Transport in den Golgi-Apparat, wo die beiden Proteasen *site-1 protease* (S1P) und *site-2 protease* (S2P) (Chen et al. 2002) einen Teil davon abspalten. Das so entstandene fragmentierte ATF6 (ATF6f) gelangt vom Golgi-Apparat in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt (Haze et al. 1999). ATF6f bewirkt die Induktion von Chaperonen wie BiP, Proteinen der ERAD und XBP1 (Yamamoto et al. 2004).

Die drei oben beschriebenen Signalwege der UPR laufen nebeneinander ab, stehen aber auch miteinander im Austausch (Ron und Walter 2007). Yoshida und Kollegen konnten zeigen, dass sich der ATF6- und der IRE1 $\alpha$ /XBP1-Signalweg gegenseitig beeinflussen. ATF6f liegt in der Zelle schneller vor als XBP1s, da seine Aktivierung nur einer Spaltung im Golgi-Apparat bedarf. ATF6f kann nach seiner Aktivierung die Transkription von XBP1 fördern (Yoshida et al. 2001). XBP1 ist andererseits stabiler, da es durch das Vorhandensein einer ERSE (*ER stress response element*)-Region in der Promotorregion die eigene Transkription fördern kann (Yoshida et al. 2000). Die Arbeitsgruppe um Yoshida entdeckte eine weitere Verbindung dieser beiden Signalwege und postulierte eine zeitabhängige Funktion der UPR. Sie zeigten, dass die Aktivierung von ATF6f primär zur Steigerung der Proteinfaltung durch die Bindung an die ERSE-Region führt, während die zeitlich darauf folgende Aktivierung von XBP1 neben der Förderung der Proteinfaltung auch eine Proteindegradierung möglich macht (Yoshida et al. 2003). Alle drei Signalwege können bei prolongiertem ERS Apoptose durch die Induktion von Bak, CHOP und CASP12 fördern. Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht der Signalwege der *Unfolded Protein Response*.



**Abbildung 2: Unfolded Protein Response als Antwort auf ER-Stress - modifiziert nach (Flamment et al. 2012, Khan et al. 2016, Wiseman et al. 2010)**

Wenn fehl- oder ungefaltete Proteine im ER akkumulieren, wird ER-Stress ausgelöst. Die Zelle reagiert als Adaptation auf diesen Stress mit der Aktivierung der *Unfolded Protein Response*. BiP bindet fehlgefaltete Proteine, dissoziiert von den Stresssensoren IRE1α, PERK und ATF6 und aktiviert diese. Aktiviertes **IRE1α** oligomerisiert, autophosphoryliert und führt zum *Splicing* von XBP1u zu XBP1s. Der Transkriptionsfaktor XBP1s steigert die Proteinfaltung durch Induktion von Chaperonen, den Proteinabbau durch Induktion von Proteinen der ERAD und die Fettsynthese. Die RNase-Aktivität von IRE1α führt zur direkten IRE1α-abhängigen Degradation von mRNA (RIDD). IRE1α initiiert Apoptose durch Bindung an TRAF2, Rekrutierung von ASK1 und Aktivierung von JNK. Daraus resultiert Transkription der Apoptose-Mediatoren CHOP und CASP12. Durch Transphosphorylierung aktiviertes **PERK** phosphoryliert eIF2α und hemmt so die Translation vieler Proteine. eIF2α aktiviert ATF4, welcher durch die Förderung der oxidativen Stressantwort und der Aminosäuresynthese primär protektiv auf die Zellhomöostase wirkt. Bei prolongiertem ERS induziert ATF4 CHOP und fördert pro-apoptotische Signale. ATF4 aktiviert auch GADD34, welches als negativer Rückkopplungsmechanismus eIF2α dephosphoryliert und den Signalweg stoppen kann. Aktiviertes **ATF6** gelangt durch vesikalen Transport in den Golgi-Apparat, wo ATF6f entsteht. ATF6f fördert als Transkriptionsfaktor die Proteinfaltung durch Induktion von BiP und XBP1 und den Proteinabbau. (weitere Erläuterungen im Text)

### 1.2.2.2 Klinische Bedeutung der *Unfolded Protein Response*

ER-Stress und die *Unfolded Protein Response* spielen in zahlreichen Erkrankungen eine wichtige Rolle (Yoshida 2007). Beispielhaft sind hier einige davon dargestellt, um die klinische Relevanz des Signaltransduktionsweges aufzuzeigen.

Im großen Komplex der neurodegenerativen Erkrankungen konnte eine Beteiligung der UPR sowohl bei einer familiären Form des Morbus Alzheimer (Katayama et al. 2001) als auch beim Morbus Parkinson nachgewiesen werden (Sado et al. 2009).

Die UPR ist ebenso in die Entwicklung der nichtalkoholischen Fettleberhepatitis (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) involviert. ERS kann durch proinflammatorische Effekte eine NASH induzieren und die hepatische Inflammation stimulieren (Malhi und Kaufman 2011).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ERS bei der Entstehung und Aufrechterhaltung akuter und chronischer Inflammation eine Rolle spielt (Grootjans et al. 2016). Einerseits kann ERS durch die Stimulation von IRE1 $\alpha$  und TRAF2 den proinflammatorischen Stimulus *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) aus dem Zellkern aktivieren (Hu et al. 2006), andererseits können proinflammatorische Stimuli, wie reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und Zytokine, ERS stimulieren und so zur Aufrechterhaltung der Inflammation beitragen. Da Sepsis mit einer generalisierten Inflammationsreaktion in Verbindung steht, wurde die Beteiligung von ERS und UPR in der Sepsis untersucht. Ma und Kollegen konnten bei septischen Mäusen eines *cecal ligation and puncture* (CLP)-Sepsis-Modells zeigen, dass es im Vergleich zur nicht-septischen Gruppe sowohl zur vermehrten Apoptose von Lymphozyten als auch zur Hochregulation von BiP, XBP1s und CHOP kam (Ma et al. 2008). Dies lässt vermuten, dass Sepsis den pro-apoptotischen Weg der UPR induzieren kann und richtet den Fokus auf den Apoptose-Mediator CHOP. Ferlito und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass die Behandlung septischer Mäuse mit Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) einen protektiven Effekt auf Sepsis-induzierte Apoptose durch die Hemmung von CHOP haben kann und dass die Deletion von CHOP in CHOP-Knockout-Mäusen einen Überlebensvorteil dieser Tiere bei Lipopolysaccharid(LPS)-induzierter Sepsis hat (Ferlito et al. 2014). Die Hemmung von ERS-induzierter Apoptose durch Cortistatin führt im Mausmodell zur Reduktion sepsisbedingter Störungen im Myokard (Zhang et al. 2015). Auch



## Einleitung

CASP12 verursacht ERS-assoziierte Apoptose. Saleh und Kollegen wiesen im Sepsis-Modell von Mäusen nach, dass CASP12-Knockout Mäuse eine Resistenz gegenüber Sepsis entwickeln, während bei Anwesenheit von CASP12 die Vulnerabilität gegenüber bakterieller Infektion und Sepsis-Sterblichkeit steigt (Saleh et al. 2006). Wie oben bereits beschrieben, wirkt GADD34 als negativer Rückkopplungsmechanismus des durch ERS ausgelösten PERK-Signalweges. Dass GADD34 im Rahmen der Sepsis ein interessantes Target ist, konnten Ito und Kollegen veranschaulichen. Im Tiermodell konnte bei Mäusen mit LPS-induzierter Sepsis demonstriert werden, dass das Vorhandensein von GADD34 einen protektiven Effekt hat. Wildtyp-Mäuse zeigten gegenüber GADD34-Knockout-Mäusen ein besseres Überleben, eine deutlich geringere Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine und eine geringere Leberzellschädigung. Dass GADD34 den ERS-Signalweg hemmt, konnte hier durch eine deutlich höhere Expression von ATF4 und CHOP in den Lebern von GADD34-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden (Ito et al. 2016).

Ob auch bei Sepsispatienten eine Assoziation von Sepsis mit ERS, der UPR und ERS-bedingter Apoptose besteht, ist aktuell Inhalt umfangreicher Untersuchungen.

### 2 Ziele der Arbeit

Sepsisbedingte Muskelgewebsschädigungen sind eine häufige und schwerwiegende Komplikation kritisch kranker Patienten. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig verstanden. Endoplasmatisches-Retikulum-Stress und die *Unfolded Protein Response* können bei septischen Patienten zur Induktion von Apoptose und damit zur Schädigung unterschiedlicher Gewebe führen. Es wird daher vermutet, dass die *Unfolded Protein Response* eine Rolle bei der Entstehung sepsisbedingter Muskelgewebsschädigungen spielt.

Ziele dieser Arbeit waren es, das Auftreten von ER-Stress und die Aktivierung der *Unfolded Protein Response* im Muskelgewebe von Patienten mit peritonealer Sepsis zu beschreiben und zu überprüfen, ob eine Assoziation dieser Signalwege mit der Pathogenese sepsisbedingter Muskelgewebsschädigungen zu erkennen ist. Die erhaltenen Ergebnisse sollten daraufhin mit Daten der Muskulatur von Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus und Kontrollpatienten verglichen werden. Außerdem wurde ein Vergleich der Befunde mit tierexperimentellen Daten angestrebt.

Die Arbeitshypothese lautete:

**Sepsis ist assoziiert mit erhöhter Inflammation in der Skelettmuskulatur und der Auslösung von ER-Stress und der *Unfolded Protein Response*. Die *Unfolded Protein Response* trägt durch ihre pro-apoptotischen Signalwege zur sepsisbedingten Schädigung der Skelettmuskulatur bei.**

Zur Überprüfung der Hypothese wurden folgende Fragen formuliert:

- 1) Kommt es in der Skelettmuskulatur von Patienten mit abdomineller Sepsis zu einer erhöhten inflammatorischen Aktivität?
- 2) Ist die *Unfolded Protein Response* als Reaktion auf ER-Stress im entzündeten Skelettmuskel nachweisbar?
- 3) Gibt es eine Assoziation zwischen der UPR und Apoptose im Skelettmuskel?
- 4) Lassen sich die Ergebnisse des humanen Studienkollektives im Mausmodell der peritonealen Sepsis reproduzieren?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Studiendesign

In dieser Arbeit wurden Signaltransduktionswege der Stress-Antwort in quergestreifter Skelettmuskultur und mögliche Zusammenhänge dieser Inflamationswege mit der Induktion von Apoptose untersucht. Als Studienkollektiv dienten hierfür Patienten mit peritonealer Sepsis, Typ 2 Diabetes mellitus und Kontrollpatienten, die sich einer therapeutischen Laparotomie unterzogen. Bei den Patienten wurden Proben von quergestreifter Skelettmuskultur und Blutproben entnommen und diese dann mittels geeigneter Methoden im Labor untersucht. Aus den Blutproben wurden Laborparameter, unter anderem zur Analyse des Entzündungsgeschehens und unterschiedlicher Stoffwechselsituationen, wie Glukosehaushalt und Fettstoffwechsel, bestimmt. Die relative Genexpression der untersuchten stressinduzierten Faktoren wurde mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) ermittelt. Zusätzlich wurde das Muskelgewebe ausgewählter Patienten histologisch durch die Anwendung unterschiedlicher Färbemethoden untersucht.

Zur Sicherung der Ergebnisse aus der humanen Studiengruppe und ihrem Vergleich mit einer anderen Population wurden Proben muriner Skelettmuskulatur aus einem konfirmatorischen Tiermodell analysiert. Auch hier wurde die relative mRNA-Expression einzelner Parameter der Stress-Antwort mittels qRT-PCR analysiert und es wurden histologische Untersuchungen durchgeführt.

#### 3.2 Einschluss von Patienten und Aufklärung

Alle Patienten des Studienkollektives wurden im Rahmen der INSIGHT (*Inflammation and hyperglycemia associated molecular Signalling in Human Tissues*)-Studie (Horn et al. 2016) eingeschlossen. Diese Studie ist im Deutschen Register Klinischer Studien registriert (Registriernummer DRKS00005450) und ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena liegt vor (Registriernummer 3247-09/11). Alle Patienten der Studie bzw. ihre gesetzlichen Betreuer wurden über die Maßnahmen der Studie aufgeklärt und haben ihr Einverständnis dazu gegeben. Die Erfassung grundlegender Patientendaten

erfolgte im persönlichen Gespräch oder durch Datenextraktion aus der Standardpatientendokumentation. Die erhaltenen Informationen wurden im Anamnesebogen der INSIGHT-Studie dokumentiert, welcher im Anhang aufgeführt ist (8.1). In der Gruppe der Sepsispatienten wurden die Werte folgender Scores am ersten postoperativen Tag berechnet: *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II* (APACHE II), SOFA und *Simplified Acute Physiology Score II* (SAPS II) (Knaus et al. 1985, Le Gall et al. 1993, Vincent et al. 1996).

Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, mussten mindestens 18 Jahre alt sein und sich einer therapeutischen Laparotomie unterziehen. Außerdem durfte in den letzten fünf Tagen keine weitere operative Maßnahme im Bereich der Schnittführung einer abdominalen Laparotomie durchgeführt worden sein. Sepsispatienten erfüllten die damals gültigen Kriterien einer Sepsis oder eines septischen Schockes gemäß der S2k Leitlinie der deutschen Sepsisgesellschaft (Reinhart et al. 2010). Patienten, die in die T2D-Gruppe eingeschlossen wurden, erfüllten die Kriterien eines metabolischen Syndroms laut *NCEP Adult Treatment Panel III*-Kriterien (National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection und Treatment of High Blood Cholesterol in 2002) oder die Kriterien der *American Diabetes Association (ADA)* bezüglich Nüchtern glukose oder HbA<sub>1c</sub> zur Diagnose des T2D (ADA 2010). Ein weiteres mögliches Einschlusskriterium in diese Patientengruppe war ein schon im Vorfeld diagnostizierter T2D und eine entsprechende antidiabetische Therapie. Kontrollpatienten mit der Notwendigkeit einer Laparotomie (beispielsweise auf Grund einer Tumorerkrankung oder einer Darmrückverlegung) erfüllten weder die oben genannten Kriterien einer Sepsis noch die eines metabolischen Syndroms bzw. einer Erkrankung mit T2D.

Ausschlusskriterien der INSIGHT-Studie waren eine Erkrankung mit Typ 1 Diabetes mellitus, chronische Einnahme von Immunsuppressiva, eine weniger als zwei Monate zurückliegende Chemotherapie, eine aktive entzündliche Erkrankung, chronische dialysepflichtige Niereninsuffizienz, vorbestehende Leberzirrhose, Zustand nach Transplantation und ein aktueller Drogenabusus.

### 3.3 Probensammlung

#### 3.3.1 INSIGHT-Studie

Nach erfolgter Aufklärung und Einwilligung der Studienpatienten erfolgte die Entnahme der Probe des quergestreiften Skelettmuskels (SM) im Rahmen der erforderlichen therapeutischen Laparotomie durch den Operateur. Die Probe wurde möglichst frühzeitig nach der Eröffnung des Abdomens und der Adhäsioolyse entnommen und durch den Operateur in einem sterilen 50 µl-Falcon (Greiner Bio-One International GmbH, Österreich) übergeben. Daraufhin wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpell ein kleiner Teil für die histologischen Untersuchungen abgetrennt und in eine feuchte Kammer auf Eis überführt. Die übrige Probe wurde daraufhin mit einer Kühlzange in flüssigem Stickstoff bei - 196 °C schockgefroren (Wollenberger et al. 1960), um Veränderungen im SM-Gewebe durch Hypoxie zu vermeiden. Nach Zerkleinerung der Probe wurde diese auf fünf Reaktionsgefäße (Sarstedt, Deutschland) aufgeteilt und bei - 80 °C bis zur Durchführung der weiteren Untersuchungen gelagert.

#### 3.3.2 Tiermodell

Die verwendeten Muskelproben aus dem vergleichenden Tiermodell wurden mir durch Herrn Dr. med. Paul Horn und Herrn Ricardo Steidl zur Verfügung gestellt. Das dazugehörige Tierversuchsvorhaben wurde durch die zuständige Behörde genehmigt (Thüringer Landesverwaltungsamt, Geschäftszeichen 02-038/12). Die Experimente wurden im Zeitraum Februar 2013 bis März 2014 durchgeführt.

Es handelt sich um Proben von männlichen, sechs Wochen alten C57BL/6J Mäusen. Diese wurden in einem Zeitraum von 12 Wochen entweder mit einer Standard-Nahrung (Kontrolldiät, KD) oder mit fettreicher Diät (*high fat diet*, HFD; ssniff, Deutschland, EF R/M D12492 mod.) gefüttert. Tiere mit HFD zeigten nach 12 Wochen phänotypische Ähnlichkeiten mit einer Erkrankung mit T2D gemessen an einer Gewichtszunahme und einer gestörten Glukosetoleranz (Horn et al 2016). Nach dem Fütterungszeitraum wurde bei einem Teil der Tiere mittels dem Modell der peritonealen Kontamination und Infektion (*peritoneal contamination and infection*, PCI) (Gonnert et al. 2011) eine polymikrobielle Sepsis induziert. Die Tiere wurden

nach dem Ablauf von 24 Stunden mit Sepsis oder ohne Sepsis (Kontrolltiere) in Isoflurannarkose versetzt und die zu untersuchenden Organe entnommen. Der *Musculus gastrocnemius* wurde bei - 196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei dieser Temperatur gelagert.

Aus diesem Tiermodell ergeben sich drei Gruppen von Tieren, welche zum Vergleich mit dem Studienkollektiv der INSIGHT-Studie herangezogen wurden: Tiere mit Kontroll-Diät (KD) als Vergleich zur Kontroll-Gruppe, Tiere mit HFD als Vergleich zur Gruppe der Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus und Tiere mit KD und Sepsis als Vergleich zur Gruppe der Sepsis-Patienten (Tab. 2).

**Tabelle 2:** Vergleichende Darstellung der beiden Kohorten dieser Arbeit

| Analysierte Gruppe | Studie          |                              |
|--------------------|-----------------|------------------------------|
|                    | INSIGHT-Studie  | Konfirmatorisches Tiermodell |
| 1                  | Kontroll-Gruppe | Kontroll-Diät                |
| 2                  | T2D-Gruppe      | <i>high fat diet</i>         |
| 3                  | Sepsis-Gruppe   | Kontroll-Diät + Sepsis       |

### 3.4 Blutentnahme und klinisch-chemische Untersuchungen

Die Blutentnahme bei den Patienten der Kontroll- und T2D-Gruppe erfolgte nach einer 8-stündigen Nüchternheit vor Beginn der operativen Maßnahme. Es wurden EDTA-Plasma (S-Monovette 9 ml K3E, Sarstedt), Citrat-Plasma (S-Monovette 9 ml K3E, Sarstedt) und Serum (S-Monovette 9 ml Z, Sarstedt) entnommen. Die Blutentnahme der Sepsispatienten erfolgte am ersten postoperativen Tag morgens ebenfalls nach einer Nüchternheitsphase von 8 Stunden.

Die antikoagulierten Vollblutproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung (max. 60 min) auf Eis gelagert und danach bei 4 °C und 3000 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde aliquotiert und bei - 80 °C eingelagert.

Die im Rahmen der klinischen Routine aufgenommenen Daten (Blutbild, C-reaktives Protein (CRP) und Kreatinin) wurden aus Patientenverlaufskurven entnommen. Die Bestimmung zusätzlicher Parameter wie Nüchternglukose, Insulin-Spiegel, IL-6 und

Hämoglobin A1c (HbA<sub>1c</sub>) erfolgte im Nachgang aus den entnommenen Blutproben. Die hierfür nötigen Untersuchungen wurden im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Jena mittels der dort gängigen validierten Methoden durchgeführt.

Das *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA-IR) wurde aus den Werten der Nüchtern glukose und des Nüchterninsulins wie folgt berechnet (Matthews et al. 1985):

$$HOMA - IR = \frac{Nüchtern glukose [mmol/l] \times Nüchtern - Insulin [mU/l]}{22,5}$$

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1 RNA-Isolation aus humanem Skelettmuskel

Zur Isolation der RNA aus humaner Skelettmuskultur wurden auf Trockeneis ca. 30 mg pro Probe mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten, wobei darauf geachtet wurde, dass die Probe nicht auftaut, und in ein neues Reaktionsgefäß (2 ml, Sarstedt) überführt. In dieses Gefäß wurden außerdem 600 µl Reaktionspuffer (pro 1 ml RLT-Puffer (Qiagen GmbH, Deutschland) wurden 10 µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) vorher hinzugegeben) pipettiert und eine Stahlkugel eingesetzt. In den verschlossenen Reaktionsgefäßen wurden die Proben mittels einer Kugelmühle bei 30 Hz und 4 min Laufzeit zerkleinert und hierdurch die Zellen aufgeschlossen. Der Überstand wurde in neue Gefäße pipettiert und für 10 min bei 12.000 xg zentrifugiert. Aus dem hier gewonnenen Überstand wurde mit Hilfe des RNeasy Minikit (Qiagen GmbH) im QiaCube (Qiagen GmbH) die gesamte RNA isoliert, welche nochmals für 5 min auf 65 °C erwärmt und anschließend auf Eis bis zur Bestimmung der RNA-Konzentration (max. 30 min) gelagert wurde (siehe 3.5.3). Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei - 80 °C.

### 3.5.2 RNA-Isolation aus murinem Skelettmuskel

Für die RNA-Isolation aus murinem Skelettmuskelgewebe wurde auf Trockeneis von jedem Muskelpräparat ein Teilstück von ca. 30 mg abgeschnitten und dieses ohne zwischenzeitliches Auftauen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die so erhaltenen Teilstücke mit 1 ml *Qiazol Lysis Reagent* (Qiagen GmbH) versetzt und in der Kugelmühle, wie oben beschrieben, aufgeschlossen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in die Reaktionsgefäße gegeben, diese geschwenkt und danach bei 4 °C und 12.000 xg 20 Minuten zentrifugiert. Die erhaltene wässrige Oberphase wurde sorgfältig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 550 µl Isopropanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 80 µl Natriumacetat (2 M, pH=4,0; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) versetzt. Die erhaltene Suspension wurde zur RNA-Präzipitation für 24 h bei - 80 °C eingefroren und am Folgetag weiterverarbeitet. Nach dem Auftauen erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation der Reaktionsgefäße bei 4 °C und 12.000 xg. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 75 %igem Ethanol (Nordbrand Nordhausen GmbH, Deutschland) zweimal resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde nach Lufttrocknung von ca. 20 min in 25 µl Nuklease-freiem Wasser (Carl Roth GmbH+Co KG, Deutschland) resuspendiert. Nach einer Erwärmung für 5 Minuten bei 65 °C erfolgte die Lagerung auf Eis bis zur Bestimmung der Konzentration (max. 30 min) (siehe 3.5.3). Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei - 80 °C.

### 3.5.3 RNA-Konzentrationsbestimmung und Eindampfen

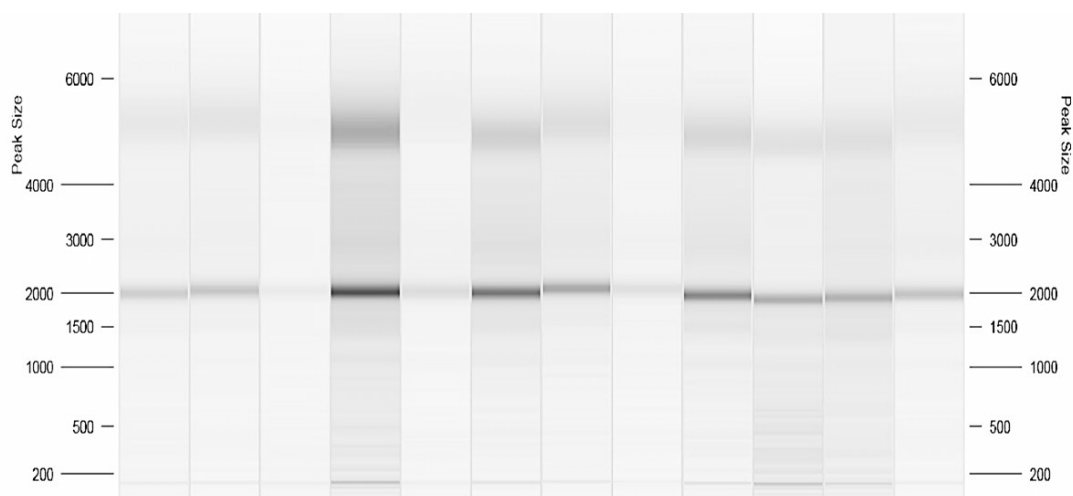
Zur Bestimmung der RNA-Konzentration der humanen und murinen Proben wurden diese am NanoDrop-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) vermessen. Dazu wurde 1 µl der Probe auf die Messeinheit aufgetragen und mittels Bestimmung der optischen Dichte sowie dem spezifischen Extinktionskoeffizienten die Konzentration bestimmt. Die Messung wurde zweifach durchgeführt und die Konzentration der RNA als Mittelwert der beiden Messwerte berechnet. Unterschieden sich die beiden Messwerte um mehr als 10 % wurde eine nochmalige Messung der RNA-Konzentration durchgeführt. Lagen die Messwerte danach immer noch zu weit auseinander, wurde eine erneute RNA-Isolation angestrebt.



Da die RNA-Konzentration der humanen Proben teilweise unter 30 ng/µl betrug und somit eine cDNA-Synthese nicht unter Standardbedingungen empfohlen war, wurden die humanen Proben am *Concentrator plus* (Eppendorf AG, Deutschland) eingedampft und danach mit 9,8 µl nuklease-freiem Wasser (Carl Roth GmbH+Co KG) resuspendiert. Die aufkonzentrierten Lösungen entsprachen den Anforderungen für die in der Einrichtung etablierte Methodik zur cDNA-Synthese (3.5.5).

### 3.5.4 RNA-Qualitätskontrolle

Die Bestimmung der RNA-Integrität erfolgte mittels Gelelektrophorese mit dem QIAxcel® *RNA Quality Control Kit* (Qiagen GmbH). Hierfür wurde je 1 µl der nach dem Eindampfen erhaltenen RNA-Suspension in die Kartusche aufgetragen und nach den Vorgaben des Herstellers die Elektrophorese durchgeführt. Im erhaltenen Datensatz und den dargestellten Gelelektrophoresen konnte dann die Qualität der RNA abgelesen werden. Die Integrität der RNA wird laut den Herstellerangaben durch eine deutliche Bande auf Höhe des „2000-Peak“ dargestellt (Abb. 3). Bei degradierter RNA liegen vor allem kürzere RNA-Fragmente vor, die sich in der Gelelektrophorese als Banden im Bereich unterhalb des 200-Peaks verdeutlichen. Die durch diese Methode erhaltenen Merkmale der RNA dienen als Zeichen ausreichender RNA-Integrität (Becker et al. 2009). Die Auswertung der RNA-Isolate mit dieser Methode zeigte, dass die total-RNA für die cDNA-Synthese genutzt werden konnte.



**Abbildung 3:** Beispielhafte Darstellung der RNA-Qualitätskontrolle mittels QIAxcel® RNA Quality Control Kit

### 3.5.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem *RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA synthesis Kits* (Thermo Fisher Scientific Inc). Mit Hilfe der vorher bestimmten RNA-Konzentration wurde berechnet, wie viele µl des Isolates für 1,0 µg RNA benötigt werden. Den Herstellerangaben folgend wurden die PCR-Reaktion zum Erhalt der cDNA dann mit einer Kombination aus OligodT- und Hexamer-Primern aus dem genannten Kit am Peltier Thermal Cycler 200 (Bio-Rad Laboratories, USA) durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde mit 180 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt und bei - 20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 3.5.6 Primerdesign und -etablierung

Primersequenzen, die in der Arbeitsgruppe noch nicht etabliert waren, wurden mit Hilfe der NCBI Primer BLAST-Datenbank erstellt (Ye et al. 2012).

Dafür galten folgende Regeln:

|                                  |                             |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Größe der Primer:                | 18-22 Basen, optimal: 20    |
| GC-Gehalt der Primer:            | 45-55 %                     |
| Schmelztemperatur der Primer:    | 59-61 °C                    |
| <i>Max Self Complementarity:</i> | <i>Any 4,0; 3' 2,0</i>      |
| Größe des PCR-Produktes:         | möglichst 70-125 Basenpaare |
| Exon-Exon-überspannend:          | falls möglich               |

Anschließend wurden die erhaltenen Primerpaare mit dem Programm OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, USA; <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) auf die Tendenz zur Bildung von Hairpins, Self-Dimeren und Heterodimeren getestet. Die Bindungsenthalpie sollte hierbei nicht unter - 10 kcal/mol liegen.

Für folgende Primer waren die Sequenzen in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden und etabliert. Human: beta-Aktin (ACTB), Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Hydroxymethylbilan-Synthase (HMBS), Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), CCL2, CD68, GLUT4. Murin: Actb, Gapdh und Hmbs.

Die Primersequenzen für XBP1u und XBP1s (von Loeffelholz et al. 2017) wurden durch Kooperationspartner des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, bereitgestellt und für diese Arbeit noch einmal auf ihre Effizienz geprüft. Die Primersequenz für das murine Xbp1s stammt aus einer Arbeit von Rodriguez et al. (Rodriguez et al. 2015).

Nach Erhalt der Primer wurden diese mit einem humanen bzw. murinen cDNA-Pool in einem PCR-Lauf wie er auch für die endgültigen Läufe verwendet wurde (s. u.) getestet. Die cDNA-Pools bestanden aus einem Gemisch von cDNA aller zu untersuchenden Proben. Hierbei wurde auf einen singulären Peak der Schmelztemperaturkurve und Übereinstimmung mit der kalkulierten Schmelztemperatur des Gesamtproduktes laut der Browser-basierten Software Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) geachtet. Der Primer konnte dann verwendet werden, wenn die kalkulierte Schmelztemperatur und die tatsächlich erhaltene Schmelztemperatur des PCR-Produktes sich um max. 2 K unterschieden.

Zur Effizienzbestimmung der Primer wurde ein PCR-Produkt in einer Verdünnungsreihe (1:1.000 bis 1:1.000.000.000) in Abhängigkeit des Ct-Wertes verdünnt und ein erneuter qRT-PCR-Lauf durchgeführt. Anhand der sich aus den Ct-Werten der Verdünnungsreihe berechneten Kurve und deren Steigung wurde die Effizienz des Primers berechnet. Es wurden nur Primer genutzt, die eine Effizienz von >1,9 aufwiesen.

Die folgenden Tabellen (Tab. 3 und Tab. 4) zeigen eine Übersicht der für diese Arbeit verwendeten Primersequenzen. Es sind jeweils der Vorwärts- (*forward*, *fw*) und der Rückwärts- (*reverse*, *rv*) Primer, die sich aus den Primern ergebende Produktgröße in Basenpaaren (bp) und die kalkulierte und tatsächliche Schmelztemperatur des PCR-Produktes angegeben.

**Tabelle 3:** Verwendete Primer für die qRT-PCR humaner Skelettmuskelproben

| Gen    | 5'-3'-Sequenzen  | Produkt-<br>größe | Kalkulierte<br>Schmelztemp. | Tatsächliche<br>Schmelztemp. |
|--------|--|-------------------|-----------------------------|------------------------------|
| ACTB   | fw: ggc atg ggt cag aag gat t<br>rv: agg tgt ggt gcc aga ttt tc        | 133 bp            | 83,64 °C                    | 83,85 °C                     |
| GAPDH  | fw: ctc tgc tcc tcc tgt tcg ac<br>rv: caa tac gac caa atc cg ttg ac    | 116 bp            | 83,54 °C                    | 84,5 °C                      |
| HMBS   | fw: atg tct ggt aac ggc aat gc<br>rv: cgt ctg tat gcg agc aag c        | 105 bp            | 83,69 °C                    | 83,9 °C                      |
| HPRT   | fw: cct ggc gtc gtg att agt gat<br>rv: aga cgt tca gtc ctg tcc ata a   | 131 bp            | 78,17 °C                    | 77,35 °C                     |
| ATF4   | fw: gtt ctc cag cga caa ggc taa<br>rv: gca tcc tcc ttg ctg ttg ttg     | 90 bp             | 82,05 °C                    | 83,45 °C                     |
| ATF6   | fw: cct tca gcg aat agc cca gt<br>rv: gca cag caa tat ctg aac cga c    | 94 bp             | 77,56 °C                    | 77,75 °C                     |
| BiP    | fw: acc gct gag gct tatt tgg g<br>rv: gtc ttt ggt tgc ttg gcg tt       | 93 bp             | 78,07 °C                    | 78,75 °C                     |
| BAX    | fw: gtc gcc ctt ttc tac ttt gcc<br>rv: cgg agg aag tcc aat gtc c       | 104 bp            | 81,85 °C                    | 83,05 °C                     |
| CASP12 | fw: gac ctt ttg ggg atg cga ga<br>rv: tgc tgt ttc cat ttc ctg agc      | 90 bp             | 76,62 °C                    | 76,65 °C                     |
| CCL2   | fw: cat agc agc ctt cat tcc<br>rv: tct gca ctg aga tct tcc tat tgg     | 101 bp            | 81,71 °C                    | 81,45 °C                     |
| CD68   | fw: gct aca tgg cgg tgg agt aca a<br>rv: atg atg aga ggc agc aag atg g | 262 bp            | 87,39 °C                    | 86,35 °C                     |
| CHOP   | fw: gag ctg gaa gcc tgg tat ga<br>rv: gac ggg tca aga gtg gtg aa       | 125 bp            | 80,08 °C                    | 79,5 °C                      |
| GADD34 | fw: ctg gct ggt gga agc agt aa<br>rv: tat ggg gga ttg cca gag ga       | 86 bp             | 81,79 °C                    | 81,55 °C                     |
| GLUT4  | fw: ctg tgg ctg gtt tct cca act<br>rv: gag gac cgc aat aga agg aag     | 106 bp            | 81,1 °C                     | 81,75 °C                     |
| ELANE  | fw: cgt ggc gaa tgt aaa cgt cc<br>rv: tta cgg ggt cgt agc cgt t        | 125 bp            | 86,06 °C                    | 87,65 °C                     |
| JNK    | fw: gat gct gtg tgg aat caa gca c<br>rv: ggc cag acc gaa gtc aag aat   | 118 bp            | 78,65 °C                    | 77,5 °C                      |

## Material und Methoden

|       |  |        |          |          |
|-------|--|--------|----------|----------|
| MPO   | fw: ccg gga tgg tga tgc gtt tt<br>rv: gtg gtg atg cct gtg ttg tc       | 117 bp | 83,67 °C | 84,45 °C |
| XBP1u | fw: gtg agc tgg aac agc aag tgg t<br>rv: cca agc gct gtc tta act cct g | 126 bp | 79,65 °C | 78,35 °C |
| XBP1s | fw: gtg agc tgg aac agc aag tgg t<br>rv: ctg cac cct gct gcg gac t     | 220 bp | 84,88 °C | 85,15 °C |

**Tabelle 4:** Verwendete Primer für die qRT-PCR muriner Skelettmuskelproben

| Gen    | 5'-3'-Sequenzen  | Produkt-<br>größe | Berechnete<br>Schmelztemp. | Tatsächliche<br>Schmelztemp. |
|--------|--|-------------------|----------------------------|------------------------------|
| Actb   | fw: gct ctt ttc cag cct tcc tt<br>rv: cgg atg tca acg tca cac tt       | 92 bp             | 77,54 °C                   | 77,85 °C                     |
| Gapdh  | fw: caa cag caa ctc cca ctc ttc<br>rv: ggt cca ggg ttt ctt act cctt    | 164 bp            | 83,05 °C                   | 82,95 °C                     |
| Hmbs   | fw: gaa atc att gct atg tcc acc a<br>rv: gcg ttt tct agc tcc ttg gta a | 98 bp             | 78,61 °C                   | 78,25 °C                     |
| Atf4   | fw: tgc gcc caa acc tta tga cc<br>rv: tgg ctg ctg tct tgt ttt gc       | 107 bp            | 79,05 °C                   | 80,95 °C                     |
| Atf6   | fw: tgg gaa tgg aag cct aaa gag g<br>rv: cgt ggg agg aca gag aaa ca    | 80 bp             | 77,4 °C                    | 79,25 °C                     |
| Bax    | fw: atg cgt cca cca aga agc tg<br>rv: cgt cag caa tca tct gc           | 90 bp             | 82,08 °C                   | 81,65 °C                     |
| Bip    | fw: cac cag gat gcg gac att ga<br>rv: cca ctt cca tag agt ttg ctg a    | 92 bp             | 76,59 °C                   | 77,95 °C                     |
| Casp12 | fw: agg tga act gac cca gat gc<br>rv: act tga ctg gga act gca tga      | 109 bp            | 79,81 °C                   | 80,0 °C                      |
| Chop   | fw: tct tga gcc taa cac gtc gat<br>rv: tcc ttc tgg aac act ctc tcc t   | 103 bp            | 81,13 °C                   | 80,55 °C                     |
| Cd68   | fw: agg acc gct tat agc cca ag<br>rv: tgt ggc tgt agg tgt cat cg       | 94 bp             | 80,05 °C                   | 80,95 °C                     |
| Gadd34 | fw: ggc ggc tca gat tgt tca aa<br>rv: ctg ccc aga cag caa gga aa       | 117 bp            | 82,43 °C                   | 84,25 °C                     |
| Xbp1u  | fw: cag act atg tgc acc tct gc<br>rv: gtg tca gag tcc atg gga          | 77 bp             | 79,71 °C                   | 81,45 °C                     |
| Xbp1s  | fw: tga gaa cca gga gtt aag aac acg<br>rv: cct gca cct gct gcg gac     | 129 bp            | 84,37 °C                   | 85,25 °C                     |

### 3.5.7 Durchführung der qRT-PCR-Reaktion

Jede humane und murine Probe wurde mittels einer Doppelbestimmung analysiert. Mit Hilfe des Pipettierroboters Corbett CAS-1200 (Qiagen GmbH) wurde der Reaktionsansatz pipettiert: Dieser setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl der cDNA der zu untersuchenden SM-Probe, 5 µl des Primermixes (bestehend aus 20 µl Forwardprimer, 20 µl Reverseprimer und 960 µl nuklease-freiem Wasser) und 10 µl des Stratagene Brilliant II SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co KG, Deutschland). Nach Überführung der Proben in die RotorGene-Q-PCR-Maschine (Qiagen GmbH) wurde die Reaktion nach folgendem in der Arbeitsgruppe etabliertem Schema durchgeführt:

Zunächst wurden die Proben für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Nach dieser Denaturierung erfolgten 40 Zyklen in diesem Muster:

|               |       |             |
|---------------|-------|-------------|
| Denaturierung | 95° C | 10 Sekunden |
| Annealing     | 60° C | 30 Sekunden |
| Elongation    | 72° C | 30 Sekunden |

Anschließend wurden die Proben denaturiert durch langsame Steigerung der Temperatur von 72 °C auf 95 °C mit einem Temperaturinkrement von 0,5 K/3 s und dadurch eine Schmelzkurve ermittelt. Aus dieser Schmelzkurve wurden die in Tab. 3 und 4 aufgeführten Schmelztemperaturen abgelesen.

Nach der Etablierung einzelner Primer ergab sich, dass die *Annealing*-Temperatur angepasst werden musste, um die Qualität der Reaktion zu verbessern. Die *Annealing*-Temperatur betrug aus diesem Grund bei folgenden Primern 61 °C: GADD34, MPO, ELANE.

### 3.5.8 Genexpressionsanalyse

Die Expression der Gene wurde anhand ihrer Ct-Werte ermittelt. Der Ct-Wert gibt dabei die Zyklusanzahl im Verlauf einer PCR an, in dem die Fluoreszenzintensität stark zu steigen beginnt. Die zu überschreitende normalisierte Fluoreszenzintensität betrug bei der Analyse für diese Arbeit den Schwellenwert von 0,035 Absorptionseinheiten. Aus den beiden aus der Doppelbestimmung erhaltenen

Ct-Werten wurde der Mittelwert für jede Probe berechnet. Für die Berechnung der relativen Genexpression wurde daraufhin die Methode nach Pfaffl (Pfaffl 2001) verwendet. Hierbei wird die Genexpression des Zielgenes auf Referenzgene, sogenannte *house keeper*, normalisiert. Zur Bestimmung der optimalen Kombination der analysierten *house keeper* wurden die Programme NormFinder (Andersen et al. 2004) und geNorm (Vandesompele et al. 2002) verwendet. So ergab sich, dass für die humanen Skelettmuskelproben die Kombination der *house keeper* GAPDH, HPRT und PBGD und für die murinen Proben die Kombination Gapdh und Hmbs benutzt wurde. Der Mittelwert dieser ausgewählten Transkripte wurde dann als Normalisierungsfaktor genutzt, durch den die mittlere Genexpression der Zieltranskripte dividiert wurde. Die durch Normalisierung erhaltene relative Genexpression der Zieltranskripte wurde daraufhin noch  $\log_2$ -logarithmiert und in Bezug auf den Median der Kontrollgruppe dargestellt (Pfaffl 2001).

### 3.6 Histologische Untersuchungen

#### 3.6.1 Vorbereitung der Muskelproben für die Histologie

Nach Entnahme der humanen Muskelprobe durch den Operateur wurde davon mit einem Skalpell ein kleines, ca. 3 mm großes Stück, abgetrennt und in einem sterilen Röhrchen bis zur weiteren Einbettung auf Eis gelagert. Nach Verlassen des Operationssaales wurde diese Probe im Schnellschnittlabor des Instituts für Pathologie im OP-Bereich in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek, Japan) eingebettet und auf Trockeneis bei - 80° C gelegt. Bei der Einbettung in das Cryomold-Kästchen (Sakura Finetek) wurde darauf geachtet, dass die Muskelfasern aufrecht und orthogonal zum Boden des Kästchens ausgerichtet waren. Dadurch sollte später ein Querschnitt durch die Muskelfaser möglich sein. Die beschrifteten Cryomold-Kästchen wurden bis zur weiteren Benutzung im Tiefkühlschrank bei - 80 °C aufbewahrt.

Die murinen Muskelproben wurden in der gleichen Weise in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek) eingebettet und bei - 80 °C gelagert. Im Gegensatz zu den humanen Proben wurde hier ein kompletter *Musculus gastrocnemicus* pro Versuchstier genutzt.

Bevor die unterschiedlichen histologischen Färbungen durchgeführt werden konnten, wurden die humanen und murinen Proben am Gefriermyotom (Kryostat CM 3050S, Leica Biosystems, USA) auf eine Probenstärke von 5 µm geschnitten, auf Objektträger aufgetragen und nochmals bei - 80 °C eingefroren.

### 3.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bevor die humanen und murinen Muskelschnitte für die Spezialfärbungen (s. u.) verwendet werden konnten, wurden die qualitativen Eigenschaften (Orientierung der Schnittrichtung in Querrichtung der Muskelfasern, Ausprägung von möglichen Gefrierartefakten) einzelner zufällig ausgewählter Serienschnitte mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) analysiert. Zur Vorbereitung dieser Färbung wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut, getrocknet und daraufhin für 10 Minuten fixiert. Die Fixationslösung setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 60 ml Aceton (Carl Roth GmbH + Co KG), 35 ml destilliertem Wasser und 5 ml 5 %igem Formaldehyd (Otto Fischar GmbH + Co KG, Deutschland). Die Menge wurde dann anhand der zu fixierenden Schnitte angepasst. Danach wurden die Schnitte wiederum für 10 Minuten getrocknet und für zwei Minuten in destilliertes Wasser gegeben. Als nächster Schritt folgte die Färbung in frisch filtriertem, im Laborbereich gelagertem Hämatoxylin nach P. Mayer (Zusammensetzung: 1 g Hämatoxylin in 1000ml destilliertem Wasser; dazu: 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kaliumaluminiumsulfat, 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure (Mayer und Gierke 1891)) für 2 Minuten. Daraufhin wurden die Schnitte für ebenfalls 2 Minuten in fließendem Leitungswasser gespült und für 7 Minuten in frisch angesetztem Eosin (100 mg Eosin (Eosin G, Merck KGAA, Deutschland) auf 100 ml dreifach destilliertem Wasser, 2 Tropfen 2 %ige Essigsäure zugesetzt) gefärbt. Nach dieser Färbung wurden die Proben in destilliertem Wasser so lange gespült, bis keine Farbrückstände mehr im Wasser zu sehen waren. Nun wurden die Proben für jeweils 2 Minuten durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100 %, 100 % Ethanol (Nordbrand Nordhausen)) und zweimalig Xylol (Carl Roth GmbH + Co KG) geführt. Abschließend wurden die Proben mit Entellan (Merck KGAA) und einem Deckglas eingebettet und bis zur Auswertung bei Raumtemperatur gelagert.



### 3.6.3 Immunhistochemische Färbung von CD68

Die immunhistochemische Färbung mit dem anti-CD68 Antikörper PG-M1 (Dako cytomation, Deutschland) erfolgte zur Detektion von CD68 als Oberflächenantigen für Makrophagen. Die Färbung der Kryoschnitte humaner Skelettmuskulatur mit diesem Antikörper wurde in Zusammenarbeit mit dem Arbeitsbereich Neuropathologie des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Jena nach dem dort bereits etabliertem Färbeprotokoll durchgeführt. Die Färbung wurde mit dem *Dako REAL<sup>TM</sup> Detection System (LSAB+) AP/RED* (Dako cytomation) entwickelt. Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin durchgeführt. Es zeigte sich eine bräunliche Färbung der positiven Makrophagen.

### 3.6.4 Immunhistochemische Färbung von XBP1

Die immunhistochemische Färbung mit dem Anti-XBP1-Antikörper (ab37152, abcam, Großbritannien) wurde in der Arbeitsgruppe etabliert und bereits publiziert (von Loeffelholz et al. 2017).

Die Vorbereitung der Objektträger mit den humanen und murinen Skelettmuskel-Proben erfolgte wie schon bei der HE-Färbung (s. o.) beschrieben. Nach Auftauen, Trocknen und Fixieren der Schnitte wurde auf diese der Peroxidaseblock (Endogenous Enzym Block, *Dako EnVision<sup>TM</sup>+ System–HRP (DAB) for rabbit primary antibodies*) für 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Danach wurden die Proben für 2 Minuten in Waschpuffer (Dako-Puffer 1:10 plus 0,05 % Tween (Riedel-de Haën, Deutschland) gewaschen und in diesem Puffer stehen gelassen. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Proben zum Blockieren für 30 Minuten in Waschpuffer mit 1 % gelöstem Bovinen Serum Albumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gegeben. Danach erfolgte der Auftrag des primären Anti-XBP1-Antikörpers (ab37152, abcam). Dieser wurde zuvor in einer Konzentration von 1:100 in Antibody Diluent (*Antibody Diluent, Background Reducing*, Dako) gelöst. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 12 h bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben wiederum in Waschpuffer gewaschen und daraufhin für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Peroxidase-Labeled-Polymer (*Dako EnVision<sup>TM</sup>+ System–HRP (DAB) for rabbit primary antibodies*) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde für

eine Minute die Substrate-Chromogen-Lösung (Dako EnVision™+ System–HRP (DAB) *for rabbit primary antibodies*) aufgetragen. Nach dem Spülen in destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit frisch filtriertem Hämatoxylin (nach P. Mayer) und das Spülen in Leitungswasser für 3 Minuten. Die gefärbten Objekte wurden abschließend mit Aquatex (Merck KGAA) und einem Deckglas eingebettet, getrocknet und bis zur Auswertung bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.6.5 TUNEL-Färbung

Die *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL)-Färbung erfolgte nach dem in der Arbeitsgruppe für humanes und murines Gewebe etablierten Protokoll mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, POD* (Roche Deutschland Holding GmbH, Deutschland). Zuerst wurden die Kryoschnitte für 1 Stunde aufgetaut, getrocknet und danach in 5 %iger Formalinlösung (Otto Fischar GmbH + Co KG) in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) fixiert. Die Schnitte wurden dann zweimal in PBS und destilliertem Wasser für jeweils 5 Minuten gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte als nächstes für 5 Minuten in einer 3 %igen Lösung von Wasserstoffperoxid in Methanol (Carl Roth GmbH+Co KG) inkubiert und daraufhin dreimal für 3 Minuten in PBS und für 1 Minute unter fließendem Wasser gewaschen. Danach wurden je 60 µl einer Mischung aus Reaktionspuffer und der terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) pro Objektträger aufgetragen und die Schnitte für 1 Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneuter dreimaliger Waschung mit PBS wurden je 60 µl Anti-Converter POD aus dem Färbekit aufgetragen und die Schnitte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Schnitte wurden wiederum dreimal in PBS gewaschen und die Färbung danach mit Hilfe des Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Cytomation) entwickelt. Dazu wurden jeweils 3 Tropfen der DAB-Lösung auf die Objektträger gegeben und diese nach einminütiger Inkubation nochmals in PBS gewaschen. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit frisch filtriertem Hämatoxylin (nach P. Mayer). Abschließend wurden die Objektträger mit Aquatex (Merck KGAA) und einem Deckglas eingedeckt und bis zur Auswertung bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.6.6 Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von CHOP und CASP12

Die indirekte Immunfluoreszenz von CHOP und CASP12 erfolgte zur Detektion dieser beiden Mediatoren der ER-Stress-bedingten Apoptose in repräsentativen Kryoschnitten humaner Skelettmuskulatur. Die Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Transkriptionsregulation“ des Lehrstuhls Biochemie, Institut für Biochemie und Biophysik, *Center for Molecular Biomedicine* (CMB), Jena nach dem dort etabliertem Färbeprotokoll durchgeführt.

Zur Färbung von CASP12 wurde zunächst der Anti-Caspase-12-Antikörper (ab62484, abcam) verwendet. Darauf hin wurde der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte zweite Antikörper *Donkey Anti-Rabbit IgG H&L* (Alexa Fluor® 647, ab150075, abcam) hinzugegeben. Die Färbung von CHOP erfolgte ebenfalls in zwei Stufen. Nach der primären Färbung mit dem Anti-CHOP-Antikörper (ab11419, abcam) erfolgte die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten zweiten Antikörpers *Goat Anti-Mouse IgG H&L* (Alexa Fluor® 568, ab175473, abcam). Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI im Einbettmedium ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (P36931, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Die Auswertung der Kryoschnitte erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop Nikon Eclipse Ti-E mit einer X-Cite®-Fluoreszenzeinheit und einer DS-Qi2-Kamera (Nikon, Japan). Dabei wurde für die Detektion von CASP12 der Cy5-Kanal und für die Detektion CHOP der Cy3-Kanal verwendet. Die Färbung mit CASP12 zeigte sich hier als ein rotes Signal, während sich die Färbung von CHOP als ein oranges Signal darstellte.

### 3.6.7 Auswertung der histologischen Färbungen

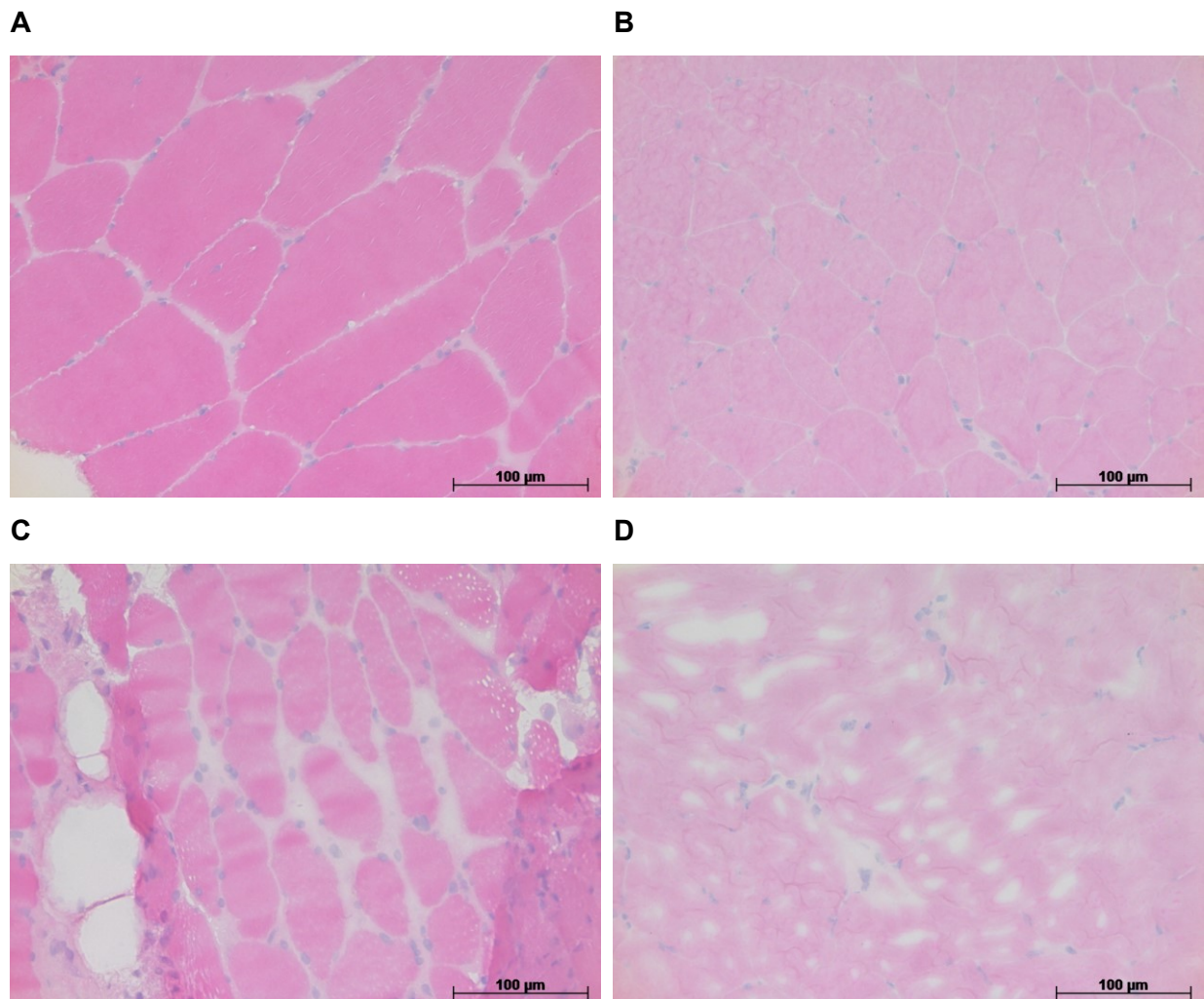
Die Auswertung der histologischen Färbungen erfolgte am Mikroskop Olympus Provis AX 70 (Olympus, Deutschland). Zur Auswertung wurden Aufnahmen in 200facher bzw. 400facher Vergrößerung angefertigt.

Zuerst erfolgte die Auswertung der HE-Färbung. Hierbei wurde eine Beurteilung aller humaner und muriner Skelettmuskelschnitte hinsichtlich folgender Parameter vorgenommen: Vorhandensein und Erscheinungsbild des dargestellten Muskelgewebes, Orientierung der Schnittrichtung (quer vs. längs) und Menge der

Gefrierartefakte (s. o.). Diese Parameter zusammenfassend erfolgte eine semiquantitative Einteilung der Schnitte nach ihrer Qualität (gut; zufriedenstellend; weniger zufriedenstellend; nicht zufriedenstellend). Tabelle 5 zeigt eine Übersicht dieser Einteilung humaner und muriner SM-Schnitte. In Abbildung 4 sind außerdem repräsentative Muskelschnitte der HE-Färbung dargestellt.

**Tabelle 5:** Übersicht über die Qualität der Muskelschnitte anhand der HE-Färbung

|           | gut | zufriedenstellend | weniger<br>zufriedenstellend | Nicht<br>zufriedenstellend |
|-----------|-----|-------------------|------------------------------|----------------------------|
| n (human) | 23  | 16                | 6                            | 17                         |
| n (Maus)  | 8   | 4                 | 3                            | -                          |



**Abbildung 4:** Beispielhafte Darstellung der Muskelschnitte nach HE-Färbung; Mikroskop Olympus Provis AX 70, 200fache Vergrößerung; **A** humaner SM „gut“; **B** muriner SM „gut“; **C** humaner SM „zufriedenstellend“; **D** muriner SM „zufriedenstellend“

Für die immunhistochemische Färbung mit dem Anti-CD68-Antikörper wurden in Absprache mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena alle Muskelschnitte verwendet. Im Gegensatz dazu wurde für die Färbung mit dem Anti-XBP1-Antikörper und die TUNEL-Färbung eine Subgruppe an Muskelschnitten ausgewählt. Die Auswahl orientierte sich dabei an der vorher anhand der HE-Färbung durchgeführten qualitativen Einschätzung der Muskelschnitte. Präparate, die als „weniger zufriedenstellend“ oder „nicht zufriedenstellend“ eingestuft worden waren, wurden für diese Färbungen nicht verwendet.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit dem anti-CD68-Antikörper erfolgte ebenfalls semiquantitativ. Hierbei wurde zuerst eine Einteilung in CD68-positive ( $CD68^{+}$ ) und CD68-negative ( $CD68^{-}$ ) Schnitte vorgenommen. Die  $CD68^{+}$  Schnitte wurden in einem zweiten Auswertungsschritt hinsichtlich ihrer Färbeintensität, der Menge an gefärbten  $CD68^{+}$ -Makrophagen und der Verteilung dieser über die Muskelschnitte eines Patienten verglichen und in drei Kategorien (+/++/+++) eingeteilt. Da die Färbung insgesamt eher schwach ausgeprägt war, gelang es nicht eine quantitative Auswertung durchzuführen. Auch eine verblindete Auswertung war auf Grund der sehr kleinen Muskelschnitte und der komponentensparenden Anordnung auf den Objektträgern nicht möglich. Die Auswertung wurde stufenweise mit Prof. Romeike aus dem Arbeitsbereich Neuropathologie des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Jena abgesprochen und für die hier untersuchte Fragestellung als ausreichend bewertet.

Auch die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit dem anti-XBP1-Antikörper erfolgte mittels einer Einteilung in positive und negative Schnitte. Hier zeigten sich insgesamt nur vereinzelte positive Zellen, sodass eine semiquantitative Auswertung nicht möglich war.

Die TUNEL-Färbung wurde nur bei einem Teil der Proben durchgeführt. Hier konzentrierte sich die Färbung auf die Proben septischen Gewebes und korrespondierender Kontrollen. Zur Auswahl der zu färbenden Proben diente die Einteilung der Qualität, die anhand der HE-Färbung durchgeführt worden war. Nach einer ersten Einteilung in TUNEL-positive ( $TUNEL^{+}$ ) und TUNEL-negative ( $TUNEL^{-}$ ) Proben konnte auch hier eine semiquantitative Auswertung mit drei Kategorien (- / + / ++ ) erfolgen.

Auch die Färbung von CHOP und CASP12 wurde nur bei repräsentativen humanen Muskelschnitten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die Einteilung der Schnitte anhand ihres Färbegrades in zwei Gruppen: „leichte Färbung“ und „verstärkte Färbung“.

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen für diese Arbeit erfolgten mit dem Programm IBM SPSS Statistics 23 (SPSS Inc, USA) und mit dem Programm Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA). Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert  $<0,05$  angewendet.

Parametrische Daten wurden zunächst mit Hilfe des Shapiro-Wilks-Tests auf Normalverteilung überprüft. Die Varianzhomogenität wurde mit der Lévenne-Berechnung überprüft. Lag diese vor, konnten die Gruppenvergleiche mit der Ein-Weg Analyse der Varianz (*Analysis of Variance*, ANOVA) mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur berechnet werden. Bei normalverteilten Daten, die keine Varianzhomogenität aufwiesen, wurde der ANOVA-Welch-Test durchgeführt. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test als nichtparametrischer Test mit Bonferroni-Holm-post-hoc-Korrektur oder Dunn's-post-hoc-Test angewendet. Für den Vergleich nominaler und ordinaler Variablen wurde der  $\chi^2$ -Test nach Pearson verwendet. Zur Berechnung von Korrelationen wurde in Abhängigkeit von der Datenverteilung entweder die Pearson- oder die Spearman-Korrelation verwendet. Dies ist jeweils angegeben. Zur Testung auf einen vorliegenden Trend nichtparametrischer Daten wurde der Jonckheere-Terpstra-Test verwendet.

Zur Visualisierung möglicher Assoziationen wurde mit der Browser-basierten Software Metaboanalyst 3.0 ([www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca)) eine Korrelationsmatrix erzeugt. Dazu wurden die log2-fachen Genexpressionsdaten mittels einer .csv-Datei in das Programm eingefügt und fehlende Werte durch den Mittelwert der Gruppe ersetzt. Die Normalisierung erfolgte durch Summennormalisierung und die Korrelationsmatrix wurde mittels Spearman-Korrelation berechnet. Die entstehenden Cluster bildeten sich dabei ohne Vorgabe einer Cluster-Anzahl aus.

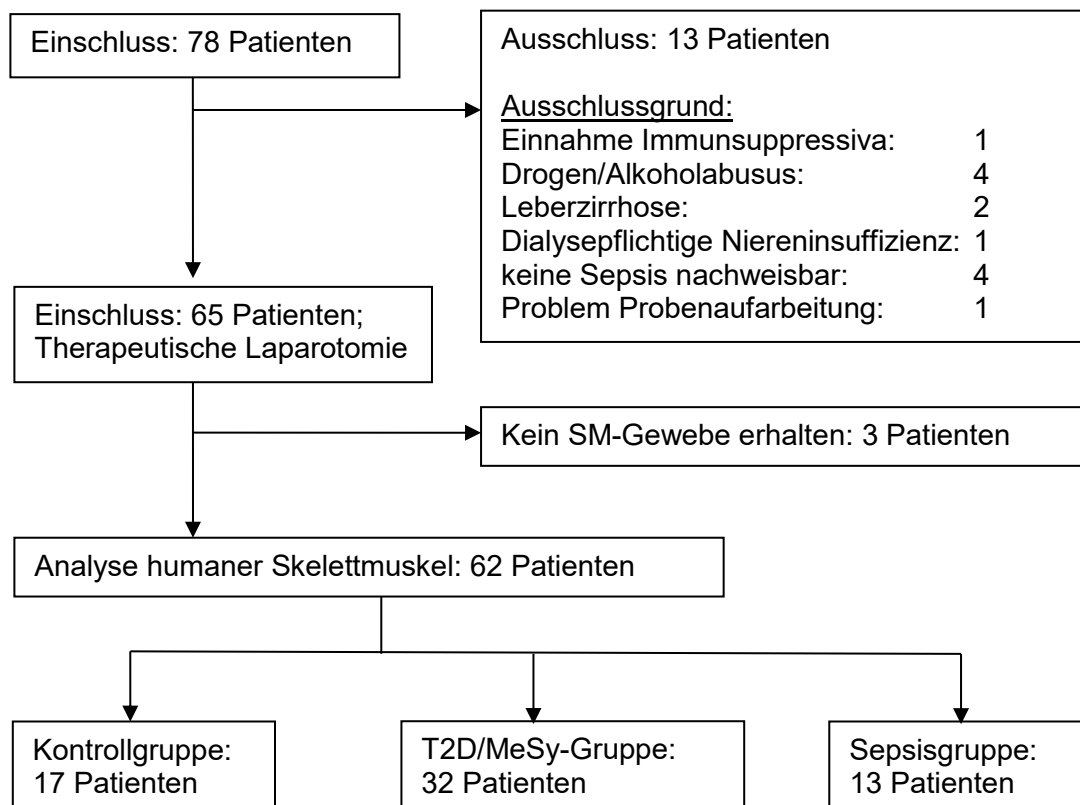
## Material und Methoden

Alle Diagramme und statistischen Darstellung wurden mit dem Programm *Prism Graphpad 6* erstellt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) angegeben und die Gruppenvergleiche durch Boxplots dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Studienpopulation der INSIGHT-Studie

Im Rahmen der INSIGHT-Studie wurden im Zeitraum November 2011 bis September 2013 78 Patienten ausgewählt, aufgeklärt und eingeschlossen. Von diesen Patienten wurden im Nachgang 13 Patienten aufgrund von später festgestellter Inkonformität mit dem Studienprotokoll wieder ausgeschlossen. Diese Gründe sind im Einzelnen in Abb. 5 dargestellt. Außerdem war es bei weiteren drei Patienten auf Grund der Eigenschaften des OP-Situs (Verwachsungen bzw. zu kleine Muskelmenge) nicht möglich, eine Probe der Skelettmuskulatur zu erhalten. Daher konnten in dieser Arbeit Proben von 62 Patienten analysiert werden. Von diesen gehörten 17 Patienten der Kontrollgruppe, 32 Patienten der Typ 2 Diabetes mellitus(T2D)/Metabolisches Syndrom(MeSy)-Gruppe und 13 Patienten der Sepsisgruppe an. Eine Übersicht des Einschlusses der Patienten in die INSIGHT-Studie zeigt Abbildung 5.



**Abbildung 5:** Übersicht über die Studiengruppen der INSIGHT-Studie

Die Charakteristika der Studienpopulation werden in der Tab. 6 dargestellt. Die Patienten in den einzelnen Gruppen unterschieden sich hinsichtlich des Alters, BMI,



## Ergebnisse

CRP, Leukozytenzahl, HbA<sub>1c</sub> und HOMA-IR (jeweils  $p < 0,05$ ). Sepsis-Patienten und T2D-Patienten waren bezüglich Alter, BMI und HOMA-IR vergleichbar. Sepsis-Patienten und Kontrollpatienten ähnelten sich bezüglich des HbA<sub>1c</sub> ( $p > 0,05$ ). Auf Grund ihrer infektiösen Krankheitsursache unterschieden sich Sepsispatienten bezüglich des CRPs, des IL-6 und der Leukozytenzahl deutlich von den anderen beiden Patientengruppen ( $p < 0,001$ ). Eine maligne Grunderkrankung lag bei den meisten Patienten vor. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich dieses Merkmales nicht ( $p = 0,226$ ).

**Tabelle 6:** Charakterisierung aller in die INSIGHT-Studie eingeschlossenen Patienten

|                                     | Kontrolle               | T2D/MeSy                | Sepsis                   | p-Wert |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------|
| n (% männlich)                      | 17 (35)                 | 32 (69)                 | 13 (57)                  | -      |
| Alter [a]                           | 55±2 <sup>a</sup>       | 65 ±1 <sup>b</sup>      | 69 ±3 <sup>b</sup>       | <0,001 |
| BMI [kg/m <sup>2</sup> ]            | 25,1±1,0 <sup>a</sup>   | 28,4±0,8 <sup>b</sup>   | 27,9±1,1 <sup>b</sup>    | 0,022  |
| CRP [mg/l]                          | 3,7±0,6 <sup>a</sup>    | 12,4±5,7 <sup>a</sup>   | 205,3±27,5 <sup>b</sup>  | <0,001 |
| IL-6 [pg/ml] <sup>1</sup>           | 4,9±1,2 <sup>a</sup>    | 7,7±1,3 <sup>a</sup>    | 623,8±228,9 <sup>b</sup> | <0,001 |
| Leukozyten [x10 <sup>3</sup> /μl]   | 6,0±0,4 <sup>a</sup>    | 7,1±0,3 <sup>a</sup>    | 17,2±1,7 <sup>b</sup>    | <0,001 |
| Thrombozyten [x10 <sup>3</sup> /μl] | 232,0±16,3 <sup>a</sup> | 255,5±12,6 <sup>a</sup> | 369,7±45,9 <sup>b</sup>  | <0,001 |
| HbA <sub>1c</sub> [%] <sup>1</sup>  | 5,4±0,1 <sup>a</sup>    | 6,9±0,3 <sup>b</sup>    | 5,7±0,3 <sup>a</sup>     | 0,001  |
| HOMA-IR [AU] <sup>1</sup>           | 1,5±0,3 <sup>a</sup>    | 4,1±0,9 <sup>b</sup>    | 4,8±1,6 <sup>b</sup>     | 0,069  |
| GlucOP [mmol/l]                     | 7,0±0,4 <sup>a</sup>    | 9,6±0,4 <sup>b</sup>    | 7,1±0,9 <sup>a</sup>     | <0,001 |
| Kreatinin [μmol/l]                  | 67,7±2,6 <sup>a</sup>   | 88,9±4,4 <sup>a</sup>   | 199,6±33,2 <sup>b</sup>  | <0,001 |
| Albumin [g/l]                       | 38,3±0,7 <sup>a</sup>   | 37,3±0,7 <sup>a</sup>   | 20,2±1,4 <sup>b</sup>    | <0,001 |
| Bilirubin [μmol/l]                  | 9,9±1,3 <sup>a</sup>    | 9,8±0,8 <sup>a</sup>    | 24,2±5,8 <sup>b</sup>    | 0,010  |
| ALAT [μmol/l]                       | 0,6±0,1                 | 0,6±0,1                 | 0,9±0,2                  | 0,638  |
| μGT [μmol/l]                        | 0,9±0,2                 | 1,6±0,5                 | 3,0±0,7                  | 0,078  |
| Quick [%]                           | 108,1±2,7 <sup>a</sup>  | 99,0±3,9 <sup>a</sup>   | 77,2±2,0 <sup>b</sup>    | <0,001 |
| Maligne Erkrankung                  | 12/17                   | 27/32                   | 8/13                     | 0,226* |

Die Daten sind angegeben als Mittelwert±SEM oder absolute Zahlen. <sup>1</sup>Diese Daten spiegeln nicht die gesamte Gruppe wider, da sie nicht von allen Patienten erhoben werden konnten ( $n_{\text{Kontrolle}}=16$ ;  $n_{\text{T2D}}=31$ ;  $n_{\text{Sepsis}}=11$ ). Die Gruppen wurden mittels ANOVA, Welch-Test oder multiplen Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Holm-post-hoc-Korrektur verglichen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch hochgestellte Buchstaben verdeutlicht; \* $\chi^2$ -Test

## Ergebnisse

Zur Verbesserung der statistischen Auswertbarkeit wurden anhand eines Matchings Gruppen zu jeweils 10 Patienten pro Studiengruppe gebildet. Aus der T2D/MeSy-Gruppe wurden hierbei nur Patienten mit diagnostiziertem Typ 2 Diabetes mellitus ausgewählt. Es wurde hierbei auf eine bessere Vergleichbarkeit der Gruppen hinsichtlich Alter und BMI geachtet. Dies war auf Grund der kleinen Studienpopulation jedoch nicht vollständig möglich. Das Matching ist eine Modifikation des Matchings aus der Publikation von Horn et al. 2016. Die Charakterisierung dieser Subgruppen ist in Tabelle 7 dargestellt.

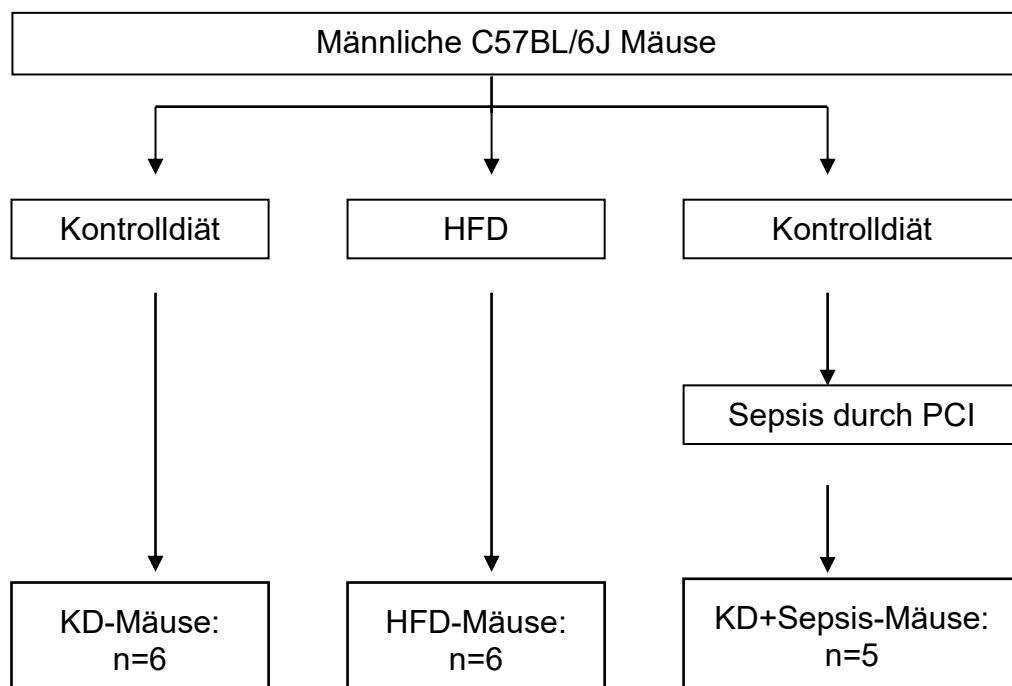
**Tabelle 7:** Charakterisierung aller durch Matching ausgewählter Patienten

|                                     | <b>Kontrolle</b>              | <b>T2D</b>                    | <b>Sepsis</b>                  | <b>p-Wert</b> |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------|
| n (% männlich)                      | <b>10 (30)</b>                | <b>10 (90)</b>                | <b>10 (70)</b>                 | -             |
| Alter [a]                           | <b>59±2<sup>a</sup></b>       | <b>67 ±2<sup>b</sup></b>      | <b>67 ±3<sup>b</sup></b>       | 0,015         |
| BMI [kg/m <sup>2</sup> ]            | <b>24,4±0,9<sup>a</sup></b>   | <b>27,9±0,6<sup>b</sup></b>   | <b>28,3±1,4<sup>b</sup></b>    | 0,027         |
| CRP [mg/l]                          | <b>3,2±0,7<sup>a</sup></b>    | <b>8,7±2,1<sup>a</sup></b>    | <b>192,9±31,7<sup>b</sup></b>  | <0,001        |
| IL-6 [pg/ml]                        | <b>6,5±1,6<sup>a</sup></b>    | <b>4,3±0,9<sup>a</sup></b>    | <b>685,2±243,8<sup>b</sup></b> | <0,001        |
| Leukozyten [x10 <sup>3</sup> /μl]   | <b>5,7±0,5<sup>a</sup></b>    | <b>6,2±0,5<sup>a</sup></b>    | <b>19,0±1,8<sup>b</sup></b>    | <0,001        |
| Thrombozyten [x10 <sup>3</sup> /μl] | <b>232,5±24,0<sup>a</sup></b> | <b>214,7±24,5<sup>a</sup></b> | <b>406,8±44,8<sup>b</sup></b>  | <0,001        |
| HbA <sub>1c</sub> [%]               | <b>5,5±0,2<sup>a</sup></b>    | <b>8,2±0,6<sup>b</sup></b>    | <b>5,8±0,3<sup>a</sup></b>     | <0,001        |
| HOMA-IR [AU]                        | <b>1,4±0,3</b>                | <b>7,5±2,4</b>                | <b>5,3±1,7</b>                 | 0,02          |
| GlucOP [mmol/l]                     | <b>7,3±0,5<sup>a</sup></b>    | <b>10,8±0,9<sup>b</sup></b>   | <b>7,6±1,1<sup>a</sup></b>     | 0,008         |
| Kreatinin [μmol/l]                  | <b>66,5±2,6<sup>a</sup></b>   | <b>92,5±7,0<sup>a</sup></b>   | <b>216,3±39,6<sup>b</sup></b>  | 0,001         |
| Albumin [g/l]                       | <b>38,6±1,0<sup>a</sup></b>   | <b>37,1±1,0<sup>a</sup></b>   | <b>20,6±1,6<sup>b</sup></b>    | <0,001        |
| Bilirubin [μmol/l]                  | <b>11,5±2,1</b>               | <b>9,2±1,3</b>                | <b>19,7±4,6</b>                | 0,102         |
| ALAT [μmol/l]                       | <b>0,6±0,1</b>                | <b>0,6±0,1</b>                | <b>0,7±0,1</b>                 | 0,906         |
| μGT [μmol/l]                        | <b>0,8±0,1</b>                | <b>2,6±1,1</b>                | <b>3,4±0,9</b>                 | 0,183         |
| Quick [%]                           | <b>108,6±4,2<sup>a</sup></b>  | <b>105,2±4,7<sup>a</sup></b>  | <b>76,9±2,2<sup>b</sup></b>    | <0,001        |
| Maligne Erkrankung                  | <b>7/10</b>                   | <b>8/10</b>                   | <b>7/10</b>                    | 0,843 *       |

Die Daten sind angegeben als Mittelwert±SEM oder absolute Zahlen. Die Gruppen wurden mittels ANOVA, Welch-Test oder multiplen Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Holm-post-hoc-Korrektur verglichen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch hochgestellte Buchstaben verdeutlicht; \*  $\chi^2$ -Test

## 4.2 Konfirmatorisches Tiermodell

Wie bereits im Kapitel Material und Methoden (3.3.2) beschrieben, wurden für das konfirmatorische Tiermodell männliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Diese wurden entweder mit einer Kontrolldiät (KD) oder einer hochkalorischen Diät (*high fat diet*, HFD) gefüttert. Die Fütterung mit der HFD-Nahrung simulierte hier einen diabetes-ähnlichen Phänotyp (Horn et al. 2016). Nach Erreichen dieses Phänotyps wurden die Tiere in die Studiengruppen (vgl. 3.3.2.) aufgeteilt und bei den Tieren der KD+Sepsis-Gruppe eine polymikrobielle Sepsis mittels des PCI-Modells induziert. Nach dem Ablauf von 24h wurden alle Tiere (mit/ohne Sepsis) narkotisiert und ihnen unter anderem der zu untersuchende *Musculus gastrocnemicus* entnommen. Aus dem Tiermodell ergaben sich die folgenden Gruppen, die zum Vergleich der Patienten der INSIGHT-Studien-Population herangezogen wurden: KD-Mäuse (n=6), HFD-Mäuse (n=6); KD+Sepsis-Mäuse(n=5) (Abb. 6).



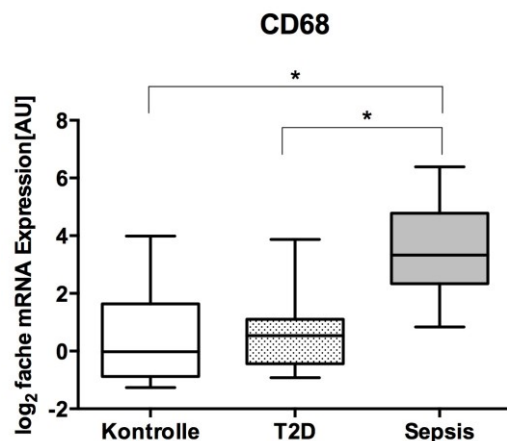
**Abbildung 6:** Übersicht über das konfirmatorische Tiermodell

In den oben erläuterten Gruppen des Tiermodells wurden vergleichend zu den humanen Proben ebenfalls Analysen hinsichtlich der relativen Genexpression durchgeführt. Die Ergebnisse humaner und muriner Untersuchungen werden im Folgenden dargestellt.

### 4.3 Muskelinflammation

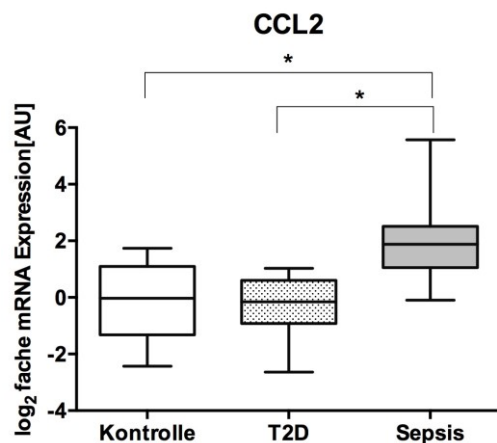
#### 4.3.1 Genexpressionsraten in humanem und murinem Skelettmuskel

Als Parameter der Gewebsinflammation in humanem Skelettmuskel wurden mehrere Gene untersucht. Die mRNA-Expression von CD68 war bei Sepsispatienten sowohl gegenüber Patienten aus der Kontrollgruppe ( $p=0,005$ ) als auch gegenüber T2D-Patienten ( $p=0,0019$ ) signifikant erhöht. Zwischen Kontrollpatienten und T2D-Patienten gab es keinen Unterschied ( $p>0,99$ ) (Abb. 7).



**Abbildung 7:**  $\log_2$ fache mRNA-Expression von CD68 im humanen SM. Die CD68 mRNA von Sepsis-Patienten war signifikant höher als von Kontrollen ( $p=0,005$ ) und von T2D-Patienten ( $p=0,019$ ); \* $p<0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-post-hoc-Korrektur.

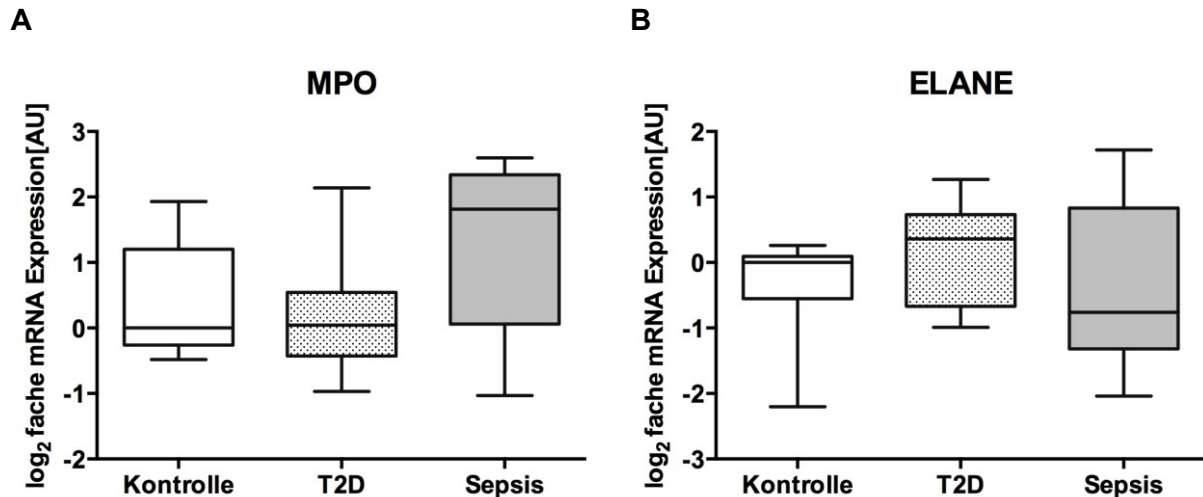
Auch die mRNA-Expression des auf Makrophagen chemotaktisch wirkenden Chemokins CCL2 unterschied sich signifikant zwischen den einzelnen Studiengruppen. Die relative Genexpression in der Sepsisgruppe war signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ( $p=0,006$ ) und gegenüber der T2D-Gruppe ( $p=0,0032$ ) erhöht. Zwischen den Patienten der Kontroll- und der T2D-Gruppe zeigte sich wiederum kein Unterschied ( $p>0,99$ ) (Abb. 8).



**Abbildung 8:**  $\log_2$ fache mRNA-Expression des Chemokins CCL2 im humanen SM. Die CCL2 mRNA von Sepsis-Patienten war signifikant sowohl gegenüber Kontrollen ( $p=0,006$ ) als auch gegenüber T2D-Patienten ( $p=0,003$ ) signifikant erhöht; \* $p<0,05$ ; ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur.

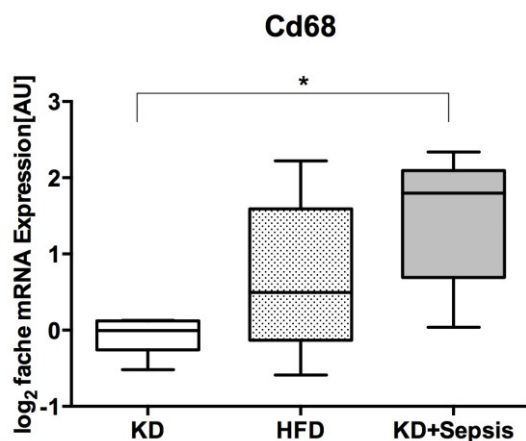
## Ergebnisse

Myeloperoxidase (MPO) und Neutrophilen-Elastase (ELANE) wurden als Marker von neutrophilen Granulozyten ebenfalls hinsichtlich ihrer mRNA-Expression in humanem Skelettmuskel untersucht. Diese war sowohl bei MPO (Abb. 9A) als auch bei ELANE (Abb. 9B) zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 9** : log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von MPO und ELANE im humanen SM. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen;  $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test **A** MPO;  $p = 0,115$  **B** ELANE;  $p = 0,206$

Vergleichend zur mRNA-Expression von CD68 in humanem Skelettmuskel wurde dieses Expressionsverhalten auch im Tiermodell untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der relativen Genexpression von Cd68 in der Gruppe der septischen Mäuse gegenüber den KD-Mäusen ( $p = 0,0016$ ). Im Vergleich der Tiere der HFD-Gruppe mit den Tieren der anderen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Veränderungen ( $p > 0,05$ ) (Abb. 10).



**Abbildung 10**: log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von Cd68 in murinem SM. Die CD68 mRNA von KD+Sepsis-Mäusen war signifikant höher als von KD-Mäusen ( $p = 0,016$ ); \* $p < 0,05$ ; ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur.

#### 4.3.2 Immunhistochemische Färbung von CD68 in humanem Skelettmuskel

Die immunhistochemische Färbung von CD68 konnte bei 61 Proben humaner Skelettmuskulatur durchgeführt werden. Eine erste Einteilung der Schnitte in die Kategorien CD68<sup>+</sup>, CD68<sup>-</sup> und „nicht auswertbar“ erbrachte dabei die in Tab. 8 dargestellte Verteilung. Muskelschnitte wurden dann als nicht auswertbar klassifiziert, wenn die Qualität nicht zufriedenstellend (vgl. Auswertung der HE-Schnitte) oder die Intensität der Färbung nicht ausreichend war.

**Tabelle 8:** Verteilung der Muskelschnitte humanem SM in der CD68-Färbung

|              | CD68 <sup>-</sup> | CD68 <sup>+</sup> | „nicht auswertbar“ |
|--------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| n (SM human) | 32                | 15                | 14                 |

Zur genaueren Analyse der Ergebnisse erfolgte als zweiter Schritt eine semiquantitative Betrachtung der CD68<sup>+</sup>-Muskelschnitte. Hier wurde eine Einteilung hinsichtlich ihrer Färbeintensität, der Menge an gefärbten CD68<sup>+</sup>-Makrophagen und der Verteilung dieser über die Muskelschnitte eines Patienten in die drei Gruppen „+“, „++“ und „+++“ vorgenommen. (vgl. 3.6.6.)

Tabelle 9 zeigt die gesamte Einteilung der auswertbaren 47 Muskelschnitte nach den untersuchten Studiengruppen der INSIGHT-Studienpopulation. In Tabelle 10 werden die Muskelproben der Patienten aus dem vorher durchgeführten Matching (Tab. 7) dargestellt.

**Tabelle 9:** Übersicht aller auswertbaren humanen SM-Schnitte in der CD68-Färbung

|                  | CD68 <sup>-</sup> | CD68 <sup>+</sup> | CD68 <sup>++</sup> | CD68 <sup>+++</sup> |
|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Kontrolle (n=13) | 13                | -                 | -                  | -                   |
| T2D (n=22)       | 19                | 3                 | -                  | -                   |
| Sepsis (n=12)    | -                 | 7                 | 2                  | 3                   |

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen hinsichtlich der CD68-Färbung ( $p < 0,001$ ),  $\chi^2$ -Test

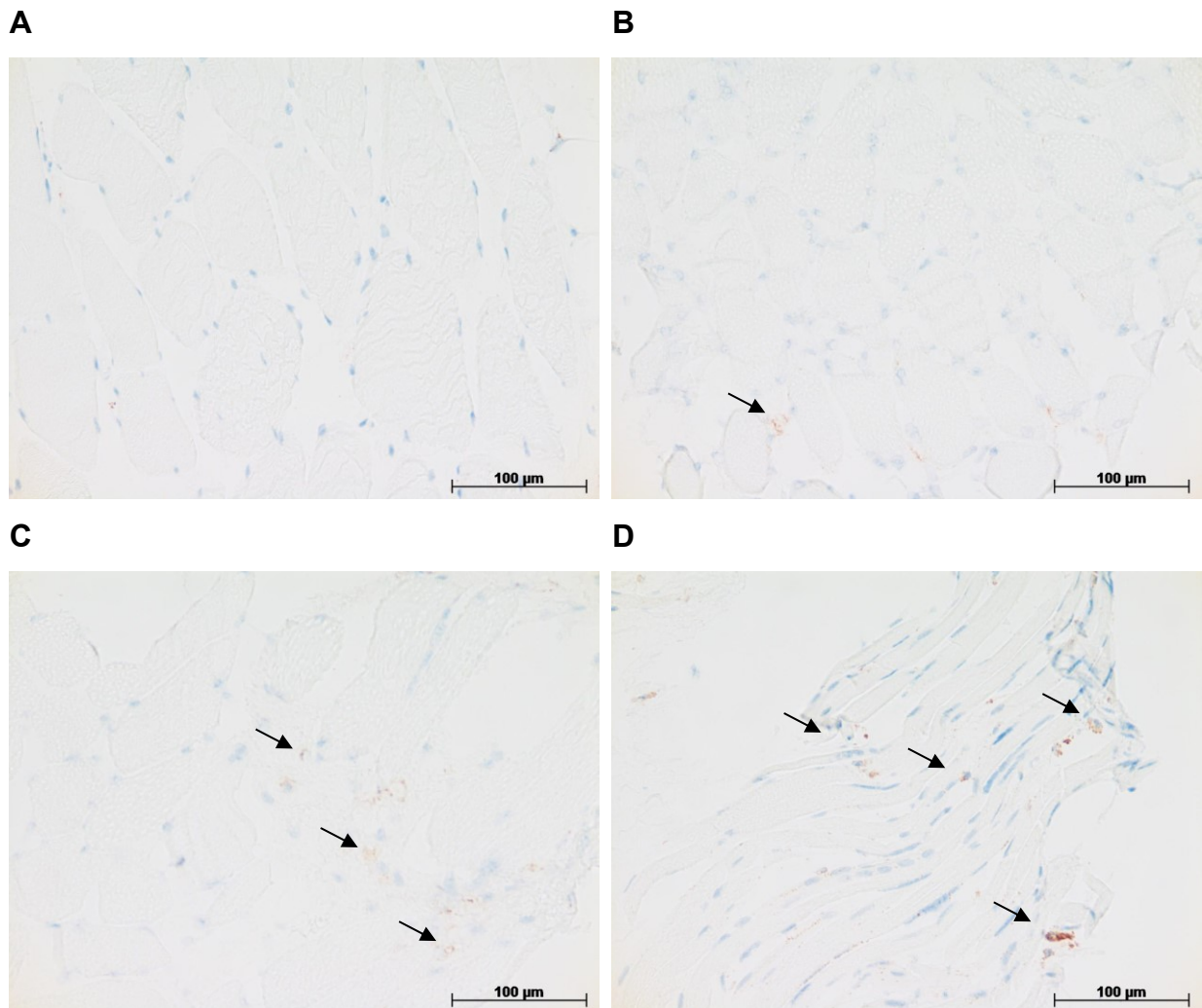
## Ergebnisse

**Tabelle 10:** Übersicht der humanen SM-Schnitte aus den Matching-Gruppen

|                 | CD68 <sup>-</sup> | CD68 <sup>+</sup> | CD68 <sup>++</sup> | CD68 <sup>+++</sup> |
|-----------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Kontrolle (n=9) | 9                 | -                 | -                  | -                   |
| T2D (n=8)       | 8                 | -                 | -                  | -                   |
| Sepsis (n=10)   | -                 | 6                 | 2                  | 2                   |

Die gematchten Patientengruppen unterschieden sich signifikant in der Färbeintensität der CD68-Färbung ( $p < 0,001$ ),  $\chi^2$ -Test

Zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Färbeintensitäten der in der Auswertung beschriebenen Gruppen zeigt Abbildung 11 beispielhafte Ausschnitte der gefärbten Muskelschnitte.



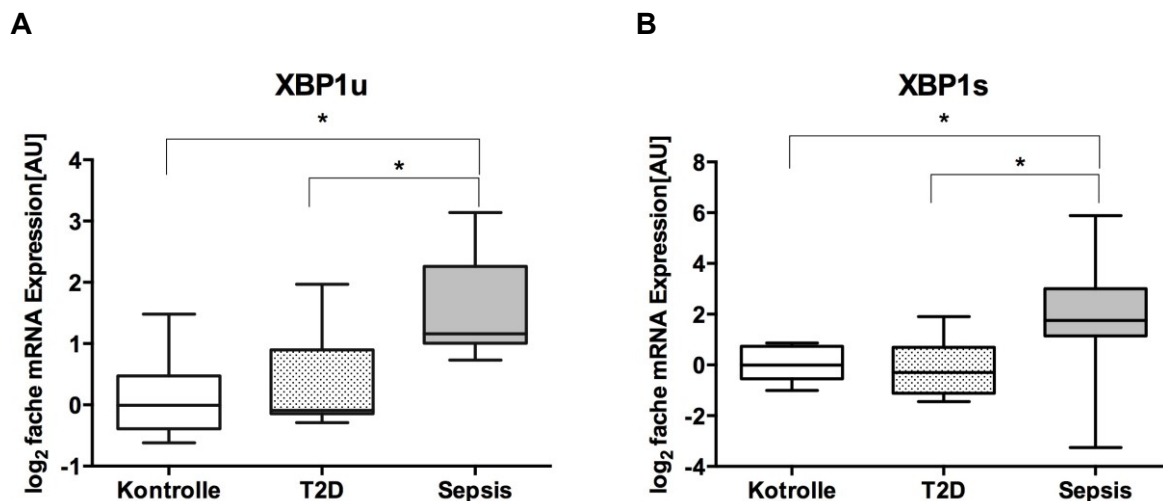
**Abbildung 11:** Darstellung der unterschiedlichen Färbeintensitäten der immunhistochemischen CD68-Färbung; Pfeile weisen auf CD68<sup>+</sup>-Zellen; Mikroskop Olympus Provis AX 70, 200fache Vergrößerung; Färbungen in Zusammenarbeit mit Arbeitsbereich Neuropathologie, Universitätsklinikum Jena; **A** humaner SM CD68<sup>-</sup>; **B** humaner SM CD68<sup>+</sup>; **C** humaner SM CD68<sup>++</sup>; **D** humaner SM CD68<sup>+++</sup>

## 4.4 ER-Stress-Signalweg

### 4.4.1 Genexpressionsraten in humanen und murinen Skelettmuskel

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob und wenn ja durch welche Sensoren ER-Stress im humanem Skelettmuskel des Studienkollektives erkannt wird und durch welchen Signalweg die *Unfolded Protein Response* ausgelöst wird, wurden die drei Signalwege der UPR anhand der Expression akzeptierter molekularer Indikatoren einzeln untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von XBP1u septischer Patienten sowohl gegenüber Kontrollpatienten ( $p=0,002$ ) als auch gegenüber T2D-Patienten ( $p=0,024$ ) (Abb. 12A). Diese signifikanten Veränderungen lagen bei der durch *Splicing* aus XBP1u entstehenden und transkriptionell aktiveren Form XBP1s ebenfalls vor. Auch hier war die mRNA-Expression von Sepsispatienten gegenüber Kontrollpatienten ( $p=0,04$ ) und gegenüber T2D-Patienten ( $p=0,021$ ) erhöht (Abb. 12B).

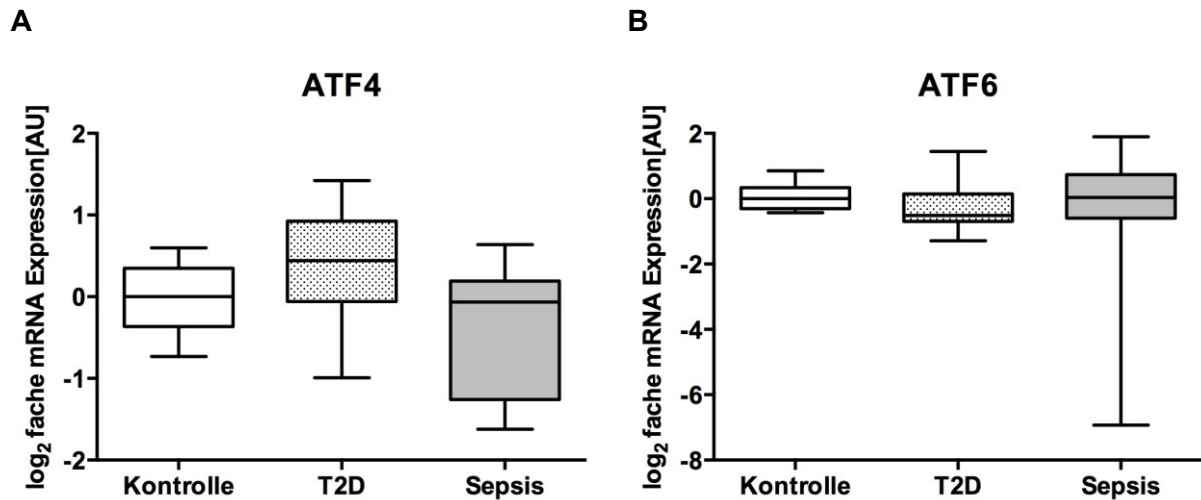
Vergleichend dazu zeigten sich bei der Analyse der relativen mRNA-Expression von ATF4 und ATF6 als repräsentative Parameter der beiden anderen Wege der UPR keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen der INSIGHT-Studie ( $p>0,05$ ) (Abb. 13A und 13B).



**Abbildung 12:** log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von XBP1u und seiner durch *Splicing* entstandenen Form XBP1s in humanem SM. **A** XBP1u mRNA von septischen Patienten war sowohl gegenüber Kontrollpatienten ( $p=0,002$ ) als auch T2D-Patienten ( $p=0,024$ ) signifikant erhöht; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-post-hoc-Korrektur **B** XBP1s mRNA von Patienten mit Sepsis war sowohl gegenüber Kontrollen ( $p=0,04$ ) als auch gegenüber T2D-Patienten ( $p=0,021$ ) signifikant erhöht; \* $p<0,05$ ; ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur

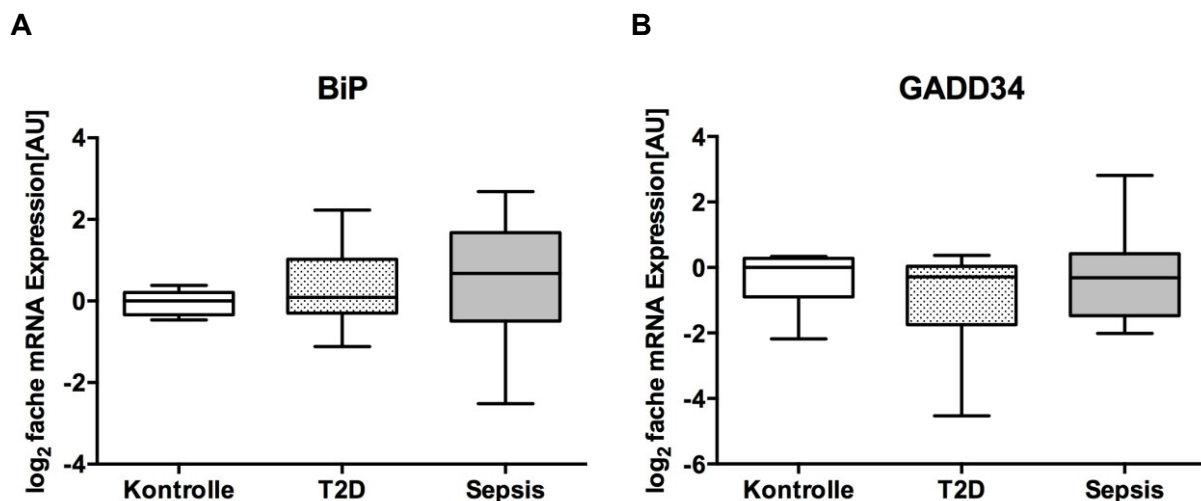


## Ergebnisse

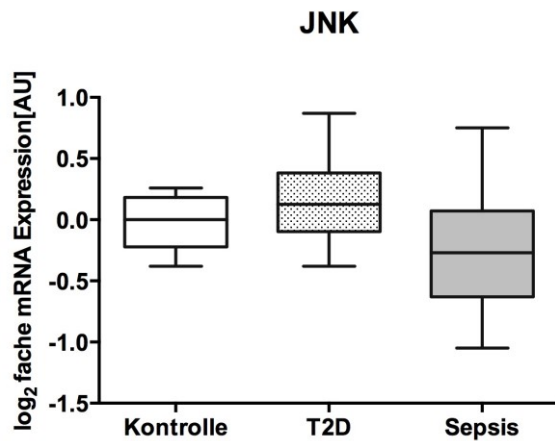


**Abbildung 13:** log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von ATF4 und ATF6 in humanem SM. Es zeigten sich bei beiden Transkripten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen **A**  $p=0,077$ ; ANOVA **B**  $p=0,33$ ; Kruskal-Wallis-Test

Zum weiteren Verständnis der UPR in humanem Skelettmuskel wurden außerdem die Veränderung der mRNA-Expression von BiP, GADD34 und JNK analysiert. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Genexpressionsraten zwischen den einzelnen Studiengruppen ( $p>0,05$ ) (Abb. 14 und 15).



**Abbildung 14:** log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von BiP und GADD34 in humanem SM. Es zeigten sich bei beiden Transkripten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen;  $p>0,05$  **A** BiP;  $p=0,423$ ; Welch-Test **B** GADD34;  $p=0,76$  Kruskal-Wallis-Test

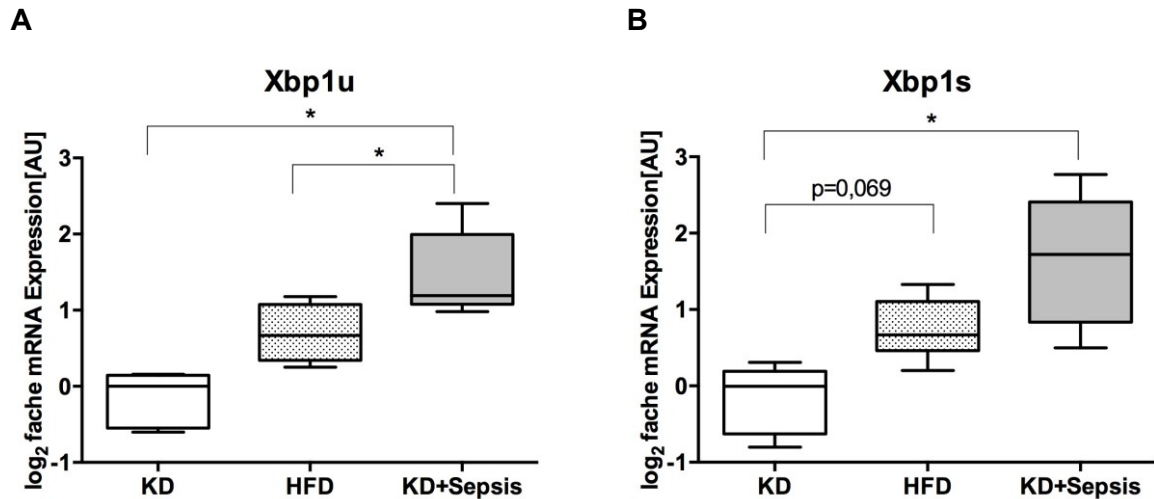


**Abbildung 15:** log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von JNK im humanen SM. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p=0,072$ ); ANOVA.

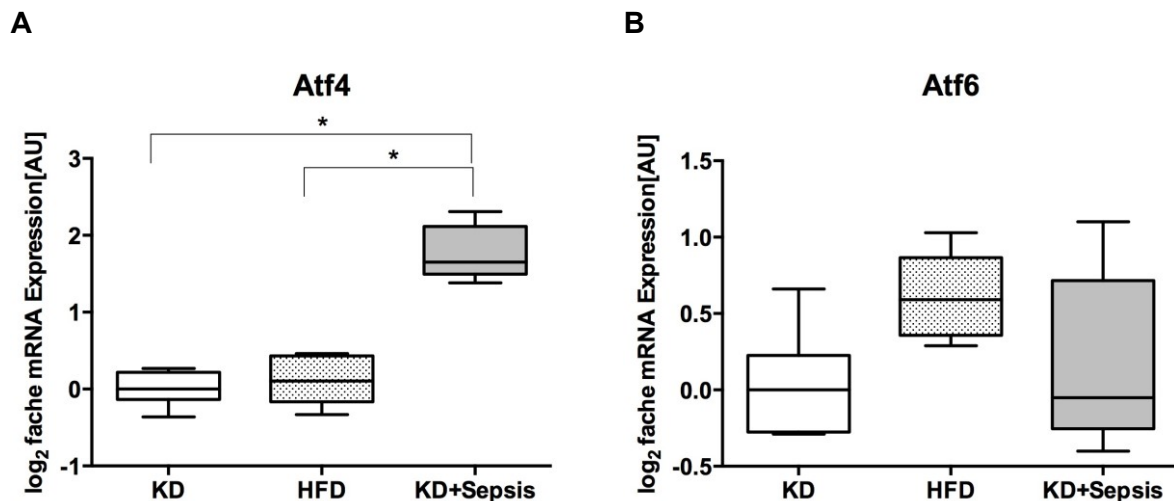
Die Genexpressionsmuster von repräsentativen Transkripten der UPR wurden auch in Proben muriner Skelettmuskulatur aus dem konfirmatorischen Tiermodell untersucht. Hier zeigten sich einerseits ähnliche Aspekte aber auch deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen aus humanem SM.

Wie im humanem SM war auch in murinem SM die mRNA-Expression von Xbp1u septischer Mäuse signifikant erhöht gegenüber KD-Mäusen ( $p<0,001$ ) und Tieren der HFD-Gruppe ( $p=0,029$ ) (Abb. 16A). Die mRNA-Expression der durch *Splicing* entstandenen Form Xbp1s war bei KD+Sepsis-Mäusen im Vergleich mit HFD-Mäusen erhöht, zeigte aber lediglich einen Trend zur statistische Signifikanz ( $p=0,069$ ). Im Vergleich der KD+Sepsis-Mäuse mit KD-Tieren war die Erhöhung der Xbp1s-mRNA-Expression jedoch wieder statistisch signifikant ( $p<0,001$ ) (Abb. 16B).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen im humanen SM zeigten sich bei der relativen mRNA-Expression von Atf4 statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen des Tiermodells. Die mRNA-Expression dieses Transkriptionsfaktors war bei KD+Sepsis-Tieren sowohl gegenüber KD-Tieren ( $p<0,001$ ) als auch gegenüber Tieren der HFD-Gruppe ( $p>0,001$ ) signifikant erhöht (Abb. 17A). Hinsichtlich der relativen Genexpression des Transkriptionsfaktors Atf6 zeigten sich auch in murinem SM keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p>0,05$ ) (Abb. 17B).

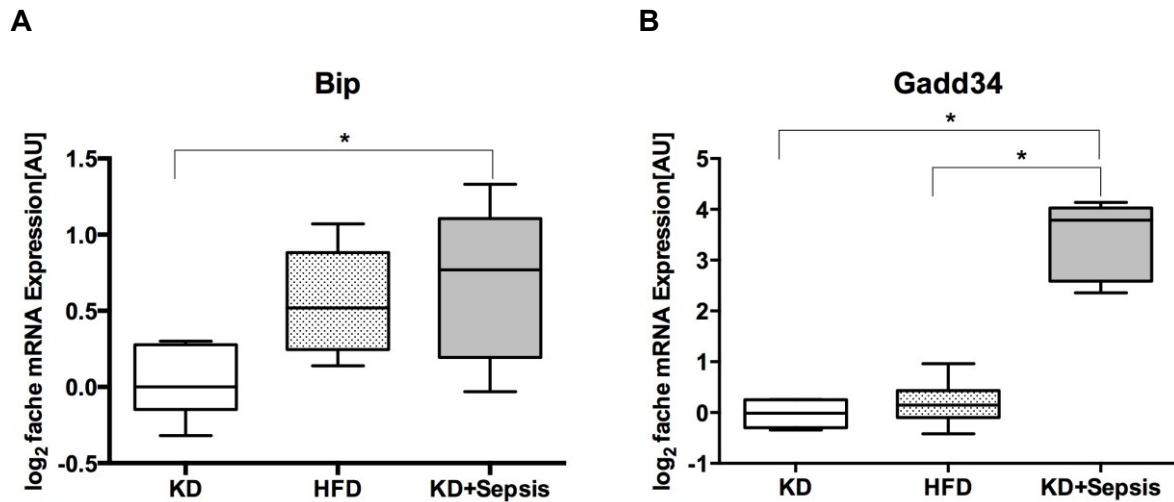


**Abbildung 16:**  $\log_2$ fache mRNA-Expression von Xbp1u und seiner durch *Splicing* entstandenen Form Xbp1s in murinem SM. **A** Xbp1u mRNA von KD+Sepsis-Mäusen war sowohl gegenüber KD-Mäusen ( $p<0,001$ ) als auch gegenüber Mäusen aus der HFD-Gruppe ( $p=0,029$ ) signifikant erhöht. **B** Xbp1s mRNA von KD+Sepsis-Mäusen war signifikant erhöht gegenüber KD-Mäusen ( $p<0,001$ ); \* $p<0,05$ ; ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur



**Abbildung 17:**  $\log_2$ fache mRNA-Expression von Atf4 und Atf6 in murinem SM. **A** Die Atf4 mRNA von KD+Sepsis-Mäusen war gegenüber KD-Mäusen ( $p<0,001$ ) und HFD-Mäusen ( $p<0,001$ ) signifikant erhöht. **B** Die mRNA-Expression von Atf6 zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen; \* $p<0,05$ ; ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur

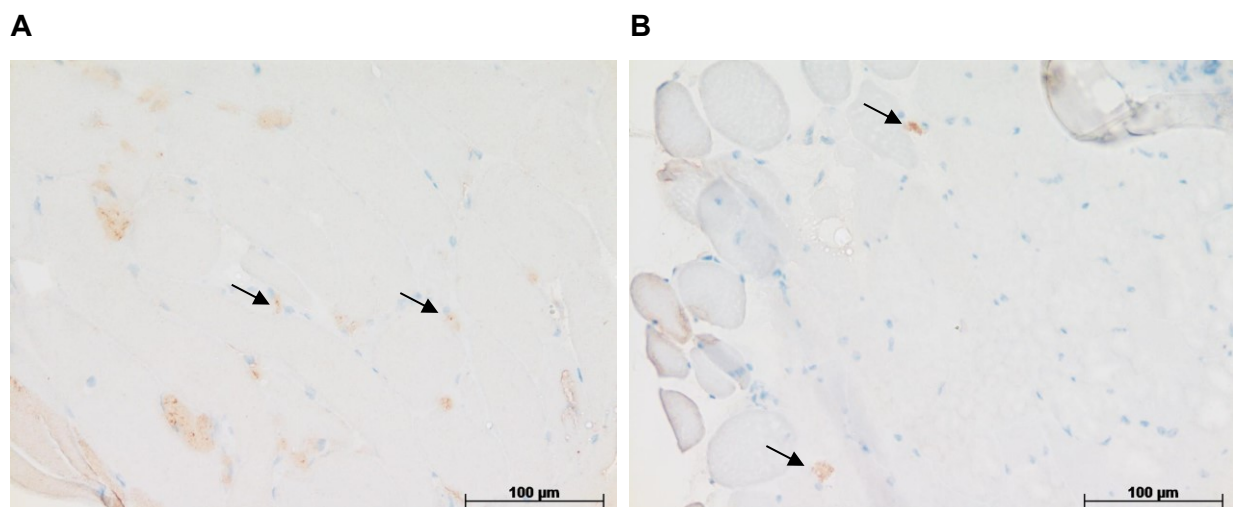
Auch bei der Analyse der mRNA-Expression von Bip und Gadd34 ergaben sich Unterschiede zwischen murinem und humanem SM. Die Genexpressionsrate von Bip bei KD+Sepsis-Mäusen war signifikant erhöht gegenüber Mäusen aus der KD-Gruppe ( $p=0,034$ ), während sich im weiteren Gruppenvergleich keine Unterschiede zeigten ( $p>0,05$ ) (Abb. 18A). Die mRNA-Expression von Gadd34 septischer Mäuse war sowohl gegenüber KD-Mäusen ( $p=0,001$ ) als auch gegenüber Mäusen aus der HFD-Gruppe ( $p<0,001$ ) signifikant erhöht (Abb. 18B).



**Abbildung 18:** log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von Bip und Gadd34 murinem SM. **A** Die Bip mRNA von KD+Sepsis-Mäusen war gegenüber KD-Mäusen signifikant erhöht ( $p=0,034$ ). **B** Die Gadd34 mRNA von KD+Sepsis-Mäusen war signifikant erhöht gegenüber KD-Mäusen ( $p=0,001$ ) und HFD-Mäusen ( $p<0,001$ ); \* $p<0,05$ ; ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur oder Games-Howell-post-hoc-Korrektur

#### 4.4.2 XBP1-Färbung in humanem und murinem Skelettmuskel

Die in humanem und murinem Skelettmuskel durchgeführte XBP1-Färbung zeigte keine spezifischen Signalanhebungen. Die Färbeintensität der Muskelfasern war innerhalb der Gruppen sehr inhomogen und die Kerne der Myozyten ließen sich nur wenig mit dem Antikörper anfärben, sodass hier keine sichere Aussage bezüglich einer XBP1-Kerntranslokation möglich war. Bei einigen Probanden der Sepsis-Gruppe und einigen septischen Mäusen konnten einzelne Kerne mit verstärkter XBP1-Anreicherung identifiziert werden. Beispiele für diese Färbung zeigt Abb. 19.



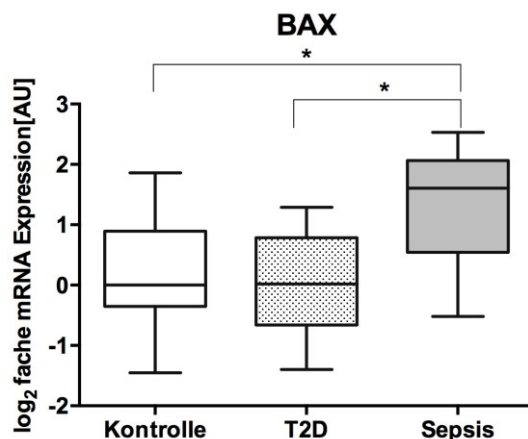
**Abbildung 19:** SM-Schnitte nach immunhistochemischer XBP1-Färbung; Pfeile weisen auf XBP1<sup>+</sup>-Zellkerne der Myozyten; Mikroskop Olympus Provis AX 70, 200fache Vergrößerung; **A** humaner SM; **B** muriner SM

## 4.5 Induktion von Apoptose

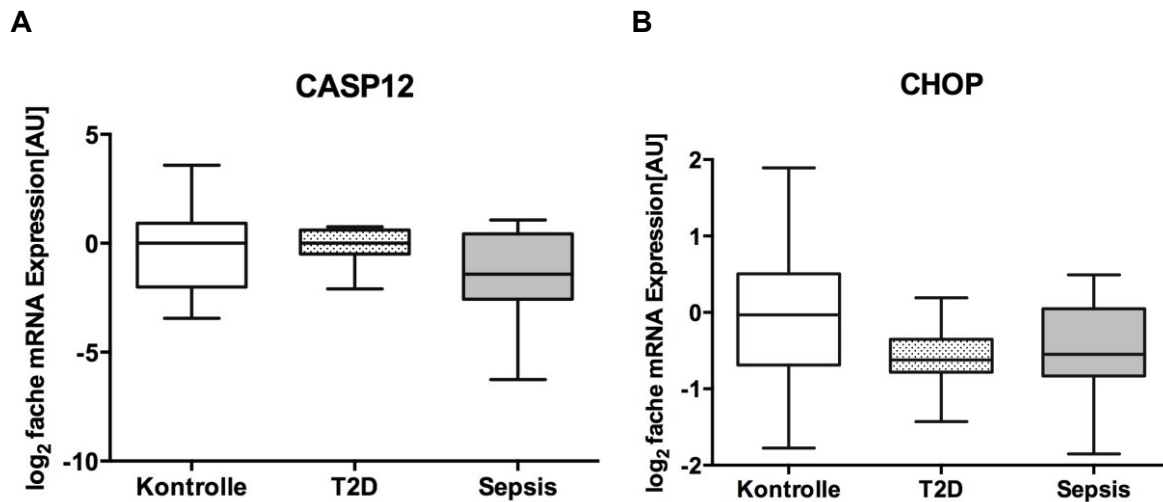
### 4.5.1 Genexpressionsraten in humanen und murinen Skelettmuskel

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob gesteigerte Inflammation im Skelettmuskel und die Aktivierung des ER-Stress-Signalweges mit der Induktion von Apoptose in Zusammenhang stehen, wurden die Genexpressionsraten des Apoptose-Regulators BAX und der Apoptose-Mediatoren CHOP und CASP12 in humanen und murinen Proben untersucht. In humanem SM war die relative Genexpression von BAX in der Sepsisgruppe signifikant erhöht sowohl gegenüber Kontroll-Patienten ( $p=0,033$ ) als auch gegenüber T2D-Patienten ( $p=0,010$ ). Zwischen der Kontrollgruppe und der T2D-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p>0,05$ ) (Abb. 20).

Im Gegensatz dazu zeigten die ER-Stress-assoziierten Apoptosemediatoren CHOP und CASP12 keine signifikanten Unterschiede der relativen mRNA-Expression zwischen den einzelnen humanen Studiengruppen ( $p>0,05$ ) (Abb. 21).

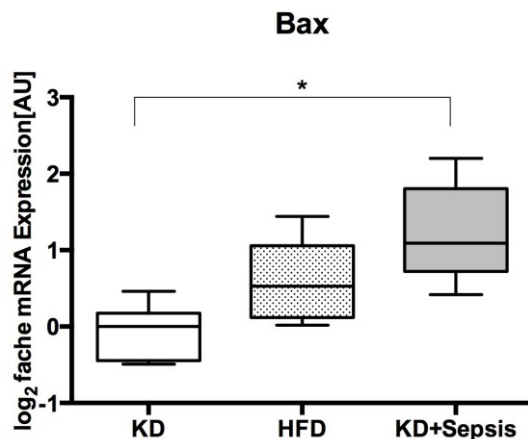


**Abbildung 20:**  $\log_2$ fache mRNA-Expression vom Apoptosemarker BAX im humanen SM. BAX mRNA von Patienten mit Sepsis war sowohl gegenüber Kontrollen ( $p=0,033$ ) als auch gegenüber T2D-Patienten ( $p=0,010$ ) signifikant erhöht;  $*p<0,05$ ; ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur.



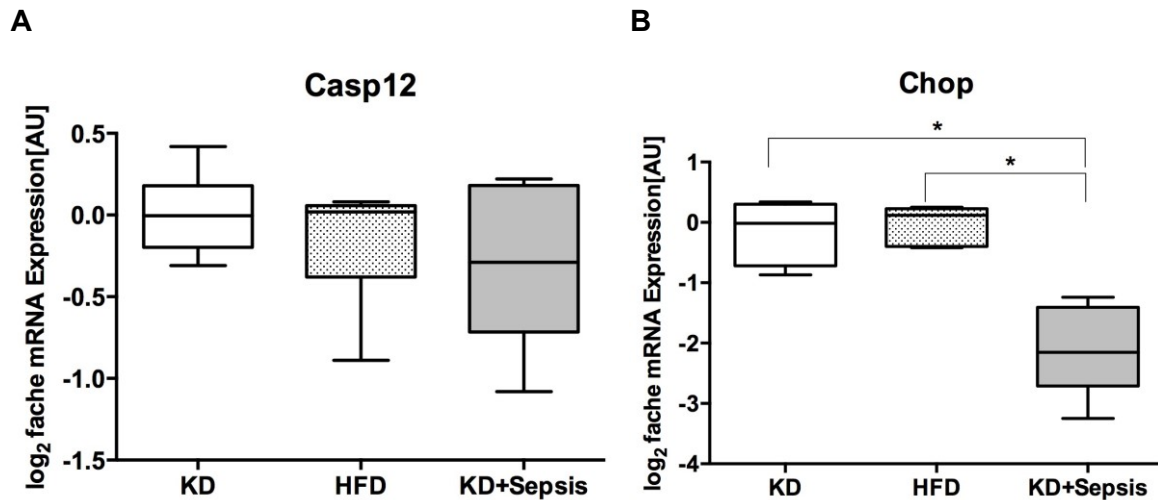
**Abbildung 21:** log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von CASP12 und CHOP in humanem SM. Es zeigten sich bei beiden Apoptosemarkern keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen; ANOVA; **A** CASP12;  $p=0,198$  **B** CHOP;  $p=0,235$

Vergleichend zu den Ergebnissen der humanen Proben zeigte sich auch bei der Analyse der relativen Genexpressionsveränderung von Bax im Tiermodell eine signifikante Hochregulation bei KD+Sepsis-Mäusen im Vergleich zu KD-Mäusen ( $p=0,003$ ) (Abb. 22).



**Abbildung 22:** log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von Bax in murinem SM. Die Bax mRNA von KD+Sepsis-Mäusen war signifikant höher als von KD-Mäusen ( $p=0,003$ ); \* $p<0,05$ ; ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur.

Auch im Mausmodell zeigt die Genexpressionsrate von Casp12 keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen ( $p>0,05$ ) (Abb. 23A). Im Gegensatz zu den humanen Proben wies die mRNA-Expression von Chop in den murinen Proben statistisch signifikante Unterschiede auf. Die relative Genexpression dieses Apoptosemediators war in der KD+Sepsis-Gruppe signifikant niedriger als in der KD-Gruppe und in der HFD-Gruppe (jeweils  $p<0,001$ ) (Abb. 23B).



**Abbildung 23:** log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von Casp12 und Chop in murinem SM. **A** Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Casp12 mRNA zwischen den Gruppen ( $p=0,714$ ); Kruskal-Wallis-Test **B** Die mRNA-Expression von Chop bei KD+Sepsis-Tieren war signifikant vermindert gegenüber KD-Tieren ( $p<0,001$ ) und HFD-Tieren ( $p<0,001$ ); ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur

#### 4.5.2 TUNEL-Färbung in humanem Skelettmuskel

Für die TUNEL-Färbung wurde nur ein Teil der humanen Skelettmuskelschnitte ausgewählt. Die Gruppe beschränkte sich auf Schnitte guter Qualität von septischen Patienten und korrespondierende Schnitte aus den anderen beiden Studiengruppen (Kontrolle, T2D). Auch hier wurde primär eine Einteilung der Schnitte in TUNEL<sup>+</sup> und TUNEL<sup>-</sup>Schnitte vorgenommen. Tabelle 11 zeigt eine Übersicht der Schnitte in den einzelnen Studiengruppen. Zur besseren statistischen Auswertung wurden die Kontroll- und die T2D-Gruppe zu einer gemeinsamen „nicht-septischen“ Gruppe zusammengefasst. Die daraus resultierende Verteilung der Schnitte zeigt Tab. 12. In der Gruppe septischer Patienten waren signifikant mehr Muskelschnitte TUNEL<sup>+</sup> (8/8) als in der Gruppe nicht septischer Patienten (2/6). Der mittels  $\chi^2$ -Test ermittelte p-Wert beträgt 0,006.

**Tabelle 11:** Übersicht der humanen SM-Schnitte nach TUNEL-Färbung

|                 | TUNEL <sup>-</sup> | TUNEL <sup>+</sup> |
|-----------------|--------------------|--------------------|
| Kontrolle (n=3) | 2                  | 1                  |
| T2D (n=3)       | 2                  | 1                  |
| Sepsis (n=8)    | -                  | 8                  |



## Ergebnisse

**Tabelle 12:** Übersicht der TUNEL-Färbung in zwei Gruppen

|                      | TUNEL <sup>-</sup> | TUNEL <sup>+</sup> |
|----------------------|--------------------|--------------------|
| Nicht-septisch (n=6) | 4                  | 2                  |
| Sepsis (n=8)         | -                  | 8                  |

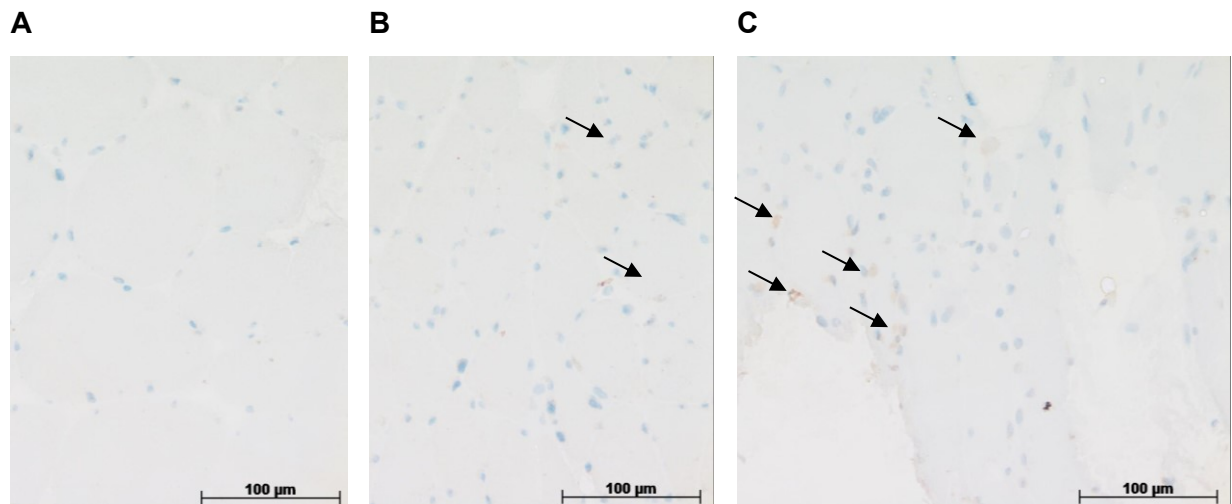
In der Gruppe der septischen Patienten sind signifikant mehr Muskelschnitte TUNEL<sup>+</sup> als in der nicht-septischen-Gruppe (p=0,006);  $\chi^2$ -Test

In einem abschließenden Auswertungsschritt erfolgte die nochmalige graduelle Einteilung der TUNEL<sup>+</sup>-SM-Schnitte in zwei Kategorien (TUNEL<sup>+</sup> und TUNEL<sup>++</sup>). Die daraus resultierende Verteilung zeigt Tab. 13. Die Färbungen unterschieden sich signifikant zwischen den Gruppen (p=0,024;  $\chi^2$ -Test). In Abbildung 24 sind die zu diesen Gruppen korrespondierenden Färbeintensitäten beispielhaft dargestellt.

**Tabelle 13:** Unterschiedliche Färbeintensitäten der TUNEL-Färbung im humanen SM

|                      | TUNEL <sup>-</sup> | TUNEL <sup>+</sup> | TUNEL <sup>++</sup> |
|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Nicht-septisch (n=6) | 4                  | 1                  | 1                   |
| Sepsis (n=8)         | -                  | 4                  | 4                   |

Die Auswertung der unterschiedlichen Färbeintensitäten der TUNEL-Färbung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen (p=0,024);  $\chi^2$ -Test



**Abbildung 24:** Darstellung der unterschiedlichen Färbeintensitäten der TUNEL-Färbung; Pfeile weisen auf TUNEL<sup>+</sup>-Zellen; Mikroskop Olympus Provis AX 70, 200fache Vergrößerung; **A** humaner SM TUNEL<sup>-</sup>; **B** humaner SM TUNEL<sup>+</sup>; **C** humaner SM TUNEL<sup>++</sup>

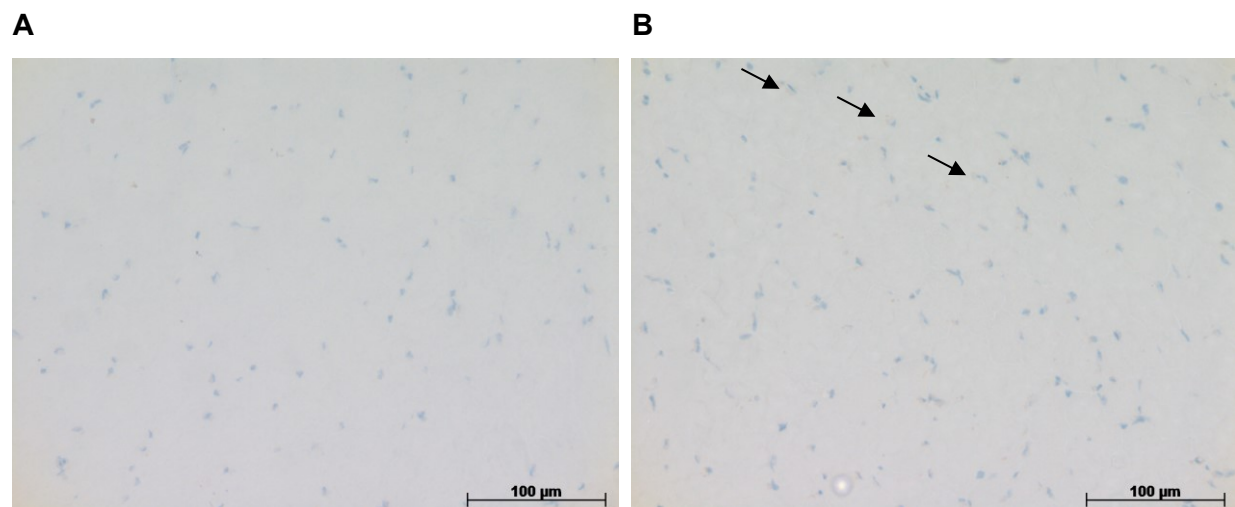


#### 4.5.3 TUNEL-Färbung in murinem Skelettmuskel

Auch im murinen SM wurde die Färbung mit der TUNEL-Methode durchgeführt. Bei den hier gefärbten neun Muskelschnitten zeigte sich die in Tabelle 14 dargestellte Einschätzung der Muskelschnitte. Eine weitere semiquantitative Auswertung war auf Grund der kleinen Anzahl gefärbter Schnitte und der geringen Färbeintensität nicht möglich. Abbildung 25 zeigt beispielhafte Ergebnisse der TUNEL-Färbung im murinen Skelettmuskel.

**Tabelle 14:** Übersicht der murinen SM-Schnitte nach TUNEL-Färbung

|                 | TUNEL <sup>-</sup> | TUNEL <sup>+</sup> |
|-----------------|--------------------|--------------------|
| KD (n=3)        | 2                  | 1                  |
| HFD (n=3)       | 3                  | -                  |
| KD+Sepsis (n=3) | 1                  | 2                  |



**Abbildung 25:** Darstellung der unterschiedlichen Färbeintensitäten der TUNEL-Färbung; Pfeile weisen auf TUNEL<sup>+</sup>-Zellen; Mikroskop Olympus Provis AX 70, 200fache Vergrößerung; **A** muriner SM TUNEL<sup>-</sup>; **B** muriner SM TUNEL<sup>+</sup>

Zur genauer statistischen Auswertung mittels  $\chi^2$ -Test wurden wiederum zwei Gruppen (nicht-septisch vs. septisch) gebildet. Hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,13$ ) (Tab. 15).

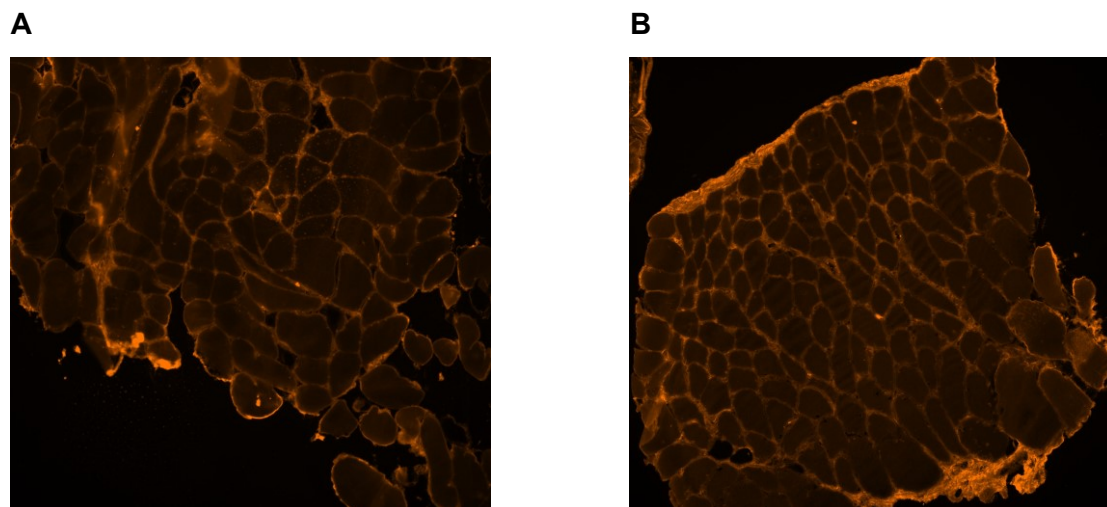
**Tabelle 15:** Übersicht der TUNEL-Färbung in zwei Gruppen

|                      | TUNEL <sup>-</sup> | TUNEL <sup>+</sup> |
|----------------------|--------------------|--------------------|
| Nicht-septisch (n=6) | 5                  | 1                  |
| Sepsis (n=3)         | 1                  | 2                  |

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der nicht-septischen und der septischen Gruppe muriner SM-Schnitte nach TUNEL-Färbung ( $p=0,13$ );  $\chi^2$ -Test

#### 4.5.4 Färbung von CHOP und CASP12 in humanem Skelettmuskel

Die Färbung der Apoptose-Mediatoren CHOP und CASP12 erfolgte in 15 repräsentativen Muskelschnitten der Patienten der INSIGHT-Studie, darunter Muskelschnitte von sieben septischen und acht nicht-septischen Patienten. Die Auswertung der CHOP-Färbung erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen der septischen und der nicht-septischen Gruppe. Beispielbilder der CHOP-Färbung aus diesen beiden Gruppen zeigt Abbildung 26.



**Abbildung 26:** Darstellung der CHOP-Färbung in humanen Muskelschnitten; Fluoreszenz-Mikroskop Nikon Eclipse Ti-E, 15fache Vergrößerung; Färbung und Mikroskopie in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Transkriptionsregulation, CMB Jena; **A** nicht-septischer Patient; **B** septischer Patient

Im Gegensatz zur CHOP-Färbung waren bei der CASP12-Färbung visuelle Unterschiede zwischen der nicht-septischen und der septischen Gruppe erkennbar. Die Einteilung der Schnitte erfolgte anhand des Intensitätsgrades der Färbung in die zwei Gruppen „schwache Färbung“ und „starke Färbung“. Tabelle 16 zeigt eine

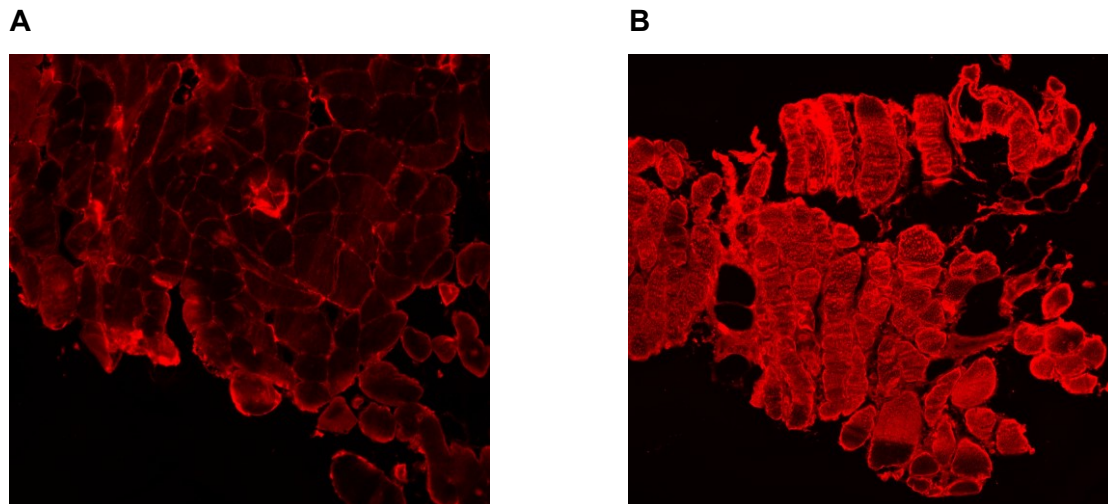
## Ergebnisse

Übersicht der beiden Gruppen hinsichtlich ihrer Färbung. In der Gruppe septischer Patienten wiesen signifikant mehr Muskelschnitte eine starke Färbung (6/7) auf als in der Gruppe nicht-septischer Patienten (1/7) ( $p=0,008$ ;  $\chi^2$ -Test). In Abbildung 27 sind die unterschiedlichen Intensitätsgrade der Färbung beispielhaft dargestellt.

**Tabelle 16:** Übersicht der CASP12-Färbung anhand des Färbegrades

|                      | Schwache CASP12-Färbung | Starke CASP12-Färbung |
|----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Nicht-septisch (n=7) | 6                       | 1                     |
| Sepsis (n=7)         | 1                       | 6                     |

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der nicht-septischen und der septischen Gruppe humaner SM-Schnitte in der CASP12-Färbung ( $p=0,008$ );  $\chi^2$ -Test



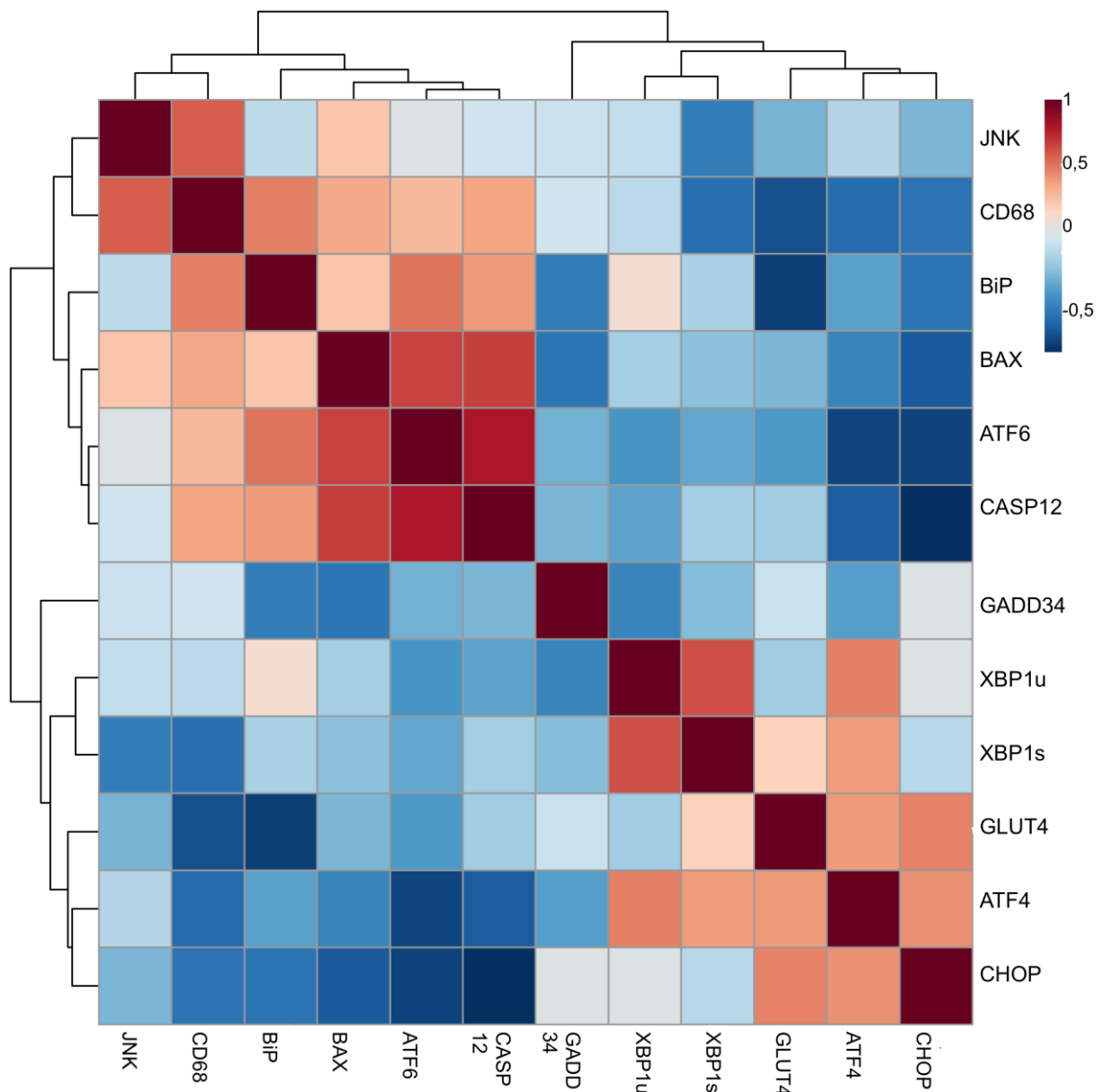
**Abbildung 27:** Darstellung der CASP12-Färbung in humanen Muskelschnitten; Fluoreszenz-Mikroskop Nikon Eclipse Ti-E, 15fache Vergrößerung; Färbung und Mikroskopie in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Transkriptionsregulation, CMB Jena; **A** schwache CASP12-Färbung; **B** starke CASP12-Färbung

### 4.6 Klinische Assoziationen

Im Rahmen der Betrachtung des ER-Stress-Signalweges und der Inflammation im Skelettmuskel von Patienten mit peritonealer Sepsis stellt sich die Frage, ob diese Phänomene miteinander assoziiert sind und ob sie Auswirkungen auf das klinische *Outcome* der Patienten haben. Aus diesem Grund wurden klinische Assoziationen der Parameter untersucht.

## Ergebnisse

Die in Abbildung 28 dargestellte Korrelationsmatrix, die mit der Browser-basierten Software Metaboanalyst 3.0 ([www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca)) erzeugt wurde (vgl. 3.7), zeigt Korrelationscluster der log2-fachen Genexpressionsdaten aus der Sepsisgruppe der INSIGHT-Studie. Es werden zwei große Cluster dargestellt. Das eine Cluster setzt sich vor allem aus den Transkripten von CD68, JNK, BiP, BAX und ATF6, das zweite Cluster aus den Transkripten von XBP1s, GLUT4, ATF4 und CHOP zusammen.

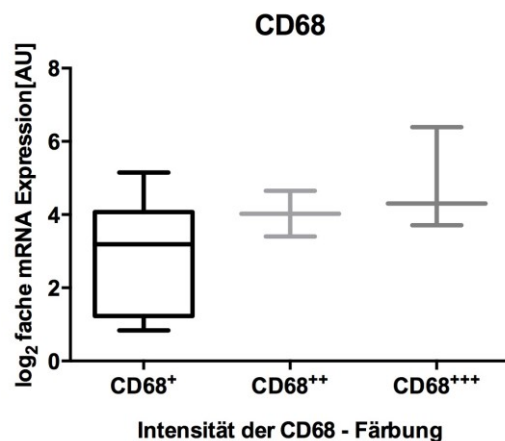


**Abbildung 28:** Korrelationsmatrix der Transkripte der Sepsis-Gruppe, berechnet mit Spearman-Korrelation

In der dargestellten Korrelationsmatrix sind die Korrelationen nicht hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz aufgeführt. Daher soll diese im Folgenden weiter betrachtet werden.

#### 4.6.1 Assoziation humaner CD68-Genexpressionsrate mit der CD68-Färbung und anderen untersuchten Zielgenen

Dass die relative Genexpression des Entzündungsmarkers CD68 in der Sepsisgruppe im Vergleich zu den beiden anderen Studiengruppen signifikant erhöht war, wurde bereits dargestellt (4.3.1; Abb. 7). Außerdem zeigte sich, dass bei Sepsispatienten die Signalintensität Gewebs-ständiger CD68<sup>+</sup>-Makrophagen deutlich gesteigert war (4.3.2; Tab. 10). Abbildung 29 zeigt hier die CD68-mRNA-Expression in der Sepsisgruppe in Abhängigkeit von der Stärke der CD68-Färbung. Umso stärker die Färbung ausgeprägt war, desto höher waren auch die mRNA-Expressionen von CD68. Dieser Trend wurde mit Hilfe des Jonckheere-Terpstra-Test überprüft und verfehlte knapp die statistische Signifikanz ( $p=0,051$ ).



**Abbildung 29:** log<sub>2</sub>fache CD68-mRNA-Expression im humanen SM der Sepsisgruppe in Abhängigkeit der Intensität der CD68-Färbung. Es zeigte sich ein annähernd statistisch signifikanter Trend ( $p=0,051$ ); Jonckheere-Terpstra-Test

Ob es zusätzlich zur oben gezeigten Assoziation noch weitere Korrelationen der CD68-mRNA-Expression mit der Genexpression anderer Transkripte der Stressantwort gibt, wurde im Folgenden überprüft. Hier wurde gezielt eine mögliche Korrelation mit anderen Teilen des oben genannten Clusters (Abb. 28) und eine Korrelation mit der ER-Stress-bedingten Apoptose untersucht. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der Korrelationsberechnungen nach Pearson dargestellt. Einerseits zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation der CD68-Genexpression mit den im ER-Stress-Signalweg beteiligten Genexpressionsveränderungen von JNK, BiP und GADD34 (jeweils  $p<0,05$ ). Eine Korrelation mit den ebenfalls für diesen Signalweg entscheidenden Transkripten ATF4, ATF6 und XBP1s lag allerdings nicht vor ( $p>0,05$ ). Betrachtet man die Mediatoren der Apoptoseinduktion zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation mit BAX ( $p=0,064$ ), jedoch eine solche mit

## Ergebnisse

CASP12 ( $p=0,031$ ). Die Korrelationen mit dem Chemokin CCL2 und der von Makrophagen exprimierten Myeloperoxidase (MPO) (jeweils  $p<0,05$ ) verdeutlichen die durch CD68<sup>+</sup>-Makrophagen unterstützte Inflamationsreaktion.

**Tabelle 17:** Bivariate Korrelation der CD68-Genexpressionsrate in der Sepsisgruppe mit Transkripten des ER-Stress-Signalweges und der Entzündungsreaktion

|        | <b>Pearson-Korrelations-<br/>Koeffizient R</b> | <b>P</b>         |
|--------|--|------------------|
| JNK    | <b>0,711</b>                                   | <b>0,003</b>     |
| BiP    | <b>0,593</b>                                   | <b>0,020</b>     |
| GADD34 | <b>0,503</b>                                   | <b>0,048</b>     |
| XBP1s  | 0,308  | 0,466            |
| ATF4   | -0,026   | 0,466            |
| ATF6   | 0,330  | 0,136            |
| BAX    | 0,445  | 0,064            |
| CASP12 | <b>0,531</b>                                   | <b>0,031</b>     |
| CCL2   | <b>0,804</b>                                   | <b>&lt;0,001</b> |
| MPO    | <b>0,521</b>                                   | <b>0,034</b>     |

Korrelationen berechnet mit dem Pearson-Korrelations-Koeffizienten (R), signifikante Korrelationen ( $p<0,05$ ) sind markiert.

### 4.6.2 Assoziation der CD68-Immunhistochemie mit der Sterblichkeit in der Sepsisgruppe

Bei kritisch-kranken Patienten, wie sie in der INSIGHT-Studie untersucht worden, kommt es häufig zur prognoselimitierenden Komplikation *critical illness myopathy*. Es stellte sich daher die Frage, ob es eine Assoziation zwischen der beobachteten gewebständigen Entzündungsreaktion, die sich durch die vermehrte Signalintensität CD68<sup>+</sup>-Makrophagen zeigte, und dem *Outcome* in der Gruppe der Sepsispatienten gab. Von elf Patienten lagen die Daten zum Überlebensstatus nach 28 Tagen (Überleben 28d) vor. Diese Patienten wurden nun hinsichtlich der Menge der CD68<sup>+</sup>-Makrophagen verglichen. Dazu wurde die Färbung in zwei Gruppen eingeteilt. In die Gruppe „schwache Färbung“ (*weak staining*) wurden die Patienten mit einfach positiver Färbung (CD68<sup>+</sup>) und in die Gruppe „starke Färbung“ (*strong staining*) die Patienten der Gruppen CD68<sup>++</sup> und CD68<sup>+++</sup> (vgl. Tab. 9) kategorisiert. Aus dem

## Ergebnisse

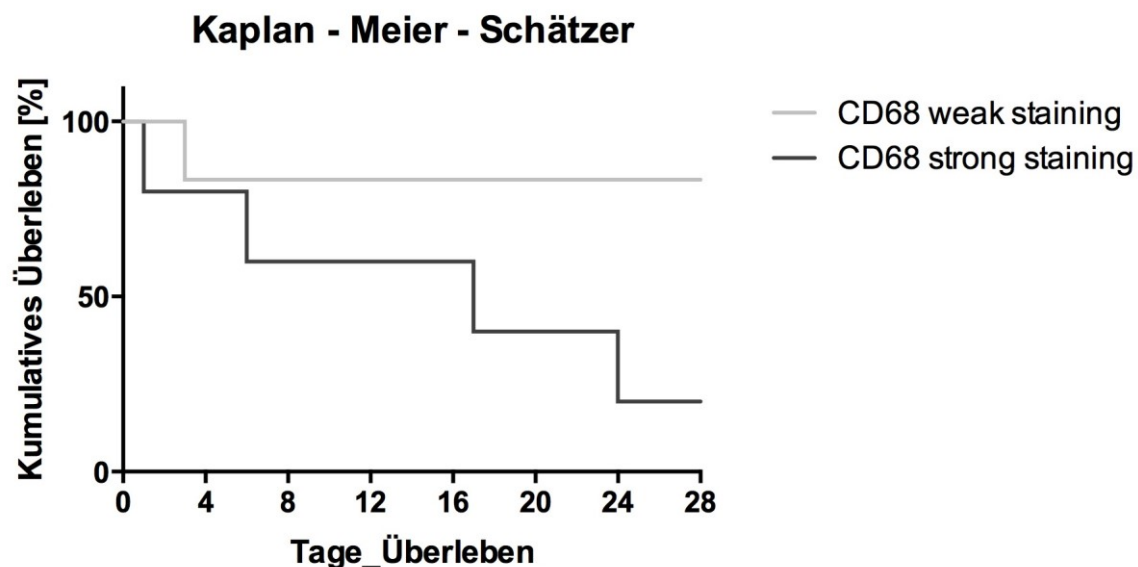
Vergleich dieser beiden Gruppen hinsichtlich des Überlebensstatus ergab sich die in Tabelle 18 gezeigte Verteilung. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,036$ ) zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich des Überlebensstatus nach 28 Tagen.

**Tabelle 18:** Übersicht des Überlebensstatus der Sepsispatienten in Abhängigkeit von der Stärke der CD68-Färbung.

|                             | Status Überleben 28d |    |
|-----------------------------|----------------------|----|
|                             | Nein                 | Ja |
| CD68 <i>weak staining</i>   | 1                    | 5  |
| CD68 <i>strong staining</i> | 4                    | 1  |

Zwischen den Gruppen zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied;  $p=0,036$ ,  $\chi^2$ -Test

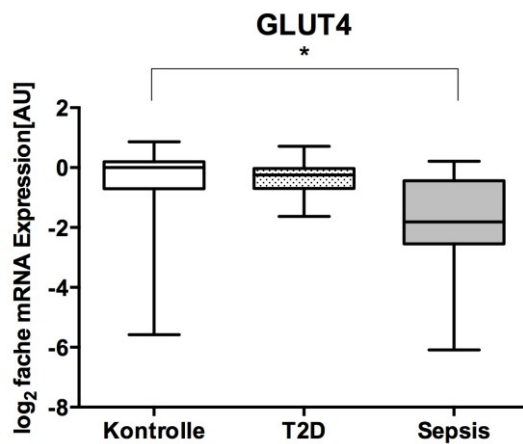
Betrachtet man die Überlebensfunktion mit einem Kaplan-Meier-Schätzer erhält man die in Abbildung 30 gezeigte Darstellung. Die Kaplan-Meier-Kurve verfehlte knapp die statistische Signifikanz ( $p=0,06$ ; Log-Rank-Test).



**Abbildung 30:** Kaplan-Meier-Schätzer des Überlebensstatus nach 28 Tagen von 11 Patienten der Sepsisgruppe in Abhängigkeit von der CD68-Färbung;  $p=0,06$ ; Log-Rank-Test

#### 4.6.3 Genexpressionsrate von GLUT4 in humanem Skelettmuskel

Sepsis-induzierte Stresshyperglykämie ist ein häufig beobachtetes klinisches Zeichen bei kritisch-kranken Patienten. Dieses Phänomen zeigt sich unter anderem in einer Veränderung der Genexpressionsrate des Insulin-abhängigen Glukosetransporters Typ 4 (GLUT4). Auch bei den Patienten der INSIGHT-Studiengruppe zeigte sich eine solche Veränderung. Die relative mRNA-Expression von GLUT4 war in der Sepsisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ( $p=0,041$ ) (Abb. 31).



**Abbildung 31:** log<sub>2</sub>fache mRNA-Expression von GLUT4 im humanen SM. GLUT4 mRNA von septischen Patienten war signifikant erniedrigt gegenüber Kontrollen ( $p=0,041$ ); \* $p<0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-post-hoc-Korrektur.

Untersucht man nun, ob es eine Assoziation der reduzierten GLUT4-mRNA-Expression mit anderen Genexpressionsraten der betrachteten Entzündungsreaktion in der Sepsisgruppe gibt, zeigte sich eine signifikante Korrelation mit dem Entzündungsmarkern CD68 und CCL2 und dem im ER-Stress-Signalweg beteiligten Transkripten BiP und GADD34 (jeweils  $p<0,05$ , Tab. 19). Eine Assoziation mit anderen Transkripten des ER-Stress-Weges und dem klinischen Schweregrad der Erkrankung (dargestellt durch den APACHE II und den SOFA-Score) zeigte sich hingegen nicht. Die Korrelation mit dem zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme gemessenen Glucose-Spiegels (GlucOP) war annähernd signifikant.



## Ergebnisse

**Tabelle 19:** Bivariate Korrelation der GLUT4-Genexpressionsrate mit Transkripten des ER-Stress-Signalweges, der Entzündungsreaktion und der Krankheitsschwere

|                 | <b>Pearson-Korrelations-<br/>Koeffizient R</b> | <b>p</b>     |
|-----------------|--|--------------|
| CD68            | <b>-0,665</b>                                  | <b>0,007</b> |
| CCL2            | <b>-0,778</b>                                  | <b>0,001</b> |
| BiP             | <b>-0,630</b>                                  | <b>0,014</b> |
| XBP1u           | -0,376   | 0,103        |
| XBP1s           | -0,291   | 0,167        |
| ATF4            | -0,115   | 0,354        |
| ATF6            | -0,278   | 0,179        |
| GADD34          | <b>-0,533</b>                                  | <b>0,037</b> |
| GlucOP [mmol/l] | <b>0,543</b>                                   | <b>0,055</b> |
| APACHE II-Score | 0,347  | 0,148        |
| SOFA-Score      | 0,058  | 0,441        |

Korrelationen berechnet mit dem Pearson-Korrelations-Koeffizienten (R), signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ ) sind markiert.

### 5 Diskussion

In der vorgelegten Arbeit konnte bei Sepsispatienten eine erhöhte Inflammation in der quergestreiften Skelettmuskulatur auf unterschiedlichen Ebenen nachgewiesen werden. Dies zeigte sich auf RNA-Ebene in der erhöhten Expression des Entzündungsmarkers CD68 und zellbiologisch in der vermehrten Anfärbbarkeit CD68<sup>+</sup>-Makrophagen im Muskelgewebe. Die Aktivierung der *Unfolded Protein Response* in septischer Skelettmuskulatur konnte vor allem durch erhöhte mRNA-Expressionen von XBP1u und XBP1s dargestellt werden. Während die vermehrte mRNA-Expression des Apoptose-Regulators BAX und die TUNEL-Färbung bei septischen Patienten eine gesteigerte Apoptose in der Muskulatur zeigten, ergab die Betrachtung der Apoptose-Mediatoren CHOP und CASP12 auf mRNA-Ebene keine deutlichen Unterschiede zwischen den Studiengruppen. Die immunhistochemischen Färbungen von CHOP und CASP12 lieferten hingegen Hinweise für die Assoziation von UPR und beobachteter Apoptose als mögliche gemeinsame Endstrecke im Skelettmuskel von Sepsispatienten. Die oben beschriebenen signifikanten Ergebnisse waren im humanen Studienkollektiv und im Mausmodell der peritonealen Sepsis größtenteils vergleichbar.

#### 5.1 Studiendesign und Eignung der ausgewählten Methoden

Um die Arbeitshypothese dieser Arbeit zu überprüfen und die dafür gestellten Fragen zu beantworten, wurden Proben quergestreifter Skelettmuskulatur von septischen Patienten und Kontrollpatienten analysiert. Alle untersuchten Patienten mussten sich einer abdominalen Laparotomie unterziehen und erfüllten die Kriterien der INSIGHT-Studie (vgl. 3.2), bei der es sich um eine prospektive Querschnittsstudie handelte (Registriernummer DRKS00005450). Bei diesen Patienten wurde das Muskelgewebe im Rahmen einer therapeutischen Laparotomie aus dem *Musculus rectus abdominis* entnommen. Durch das zusätzliche Gewinnen von Blutproben der in die Studie eingeschlossenen Patienten und die Durchführung einer genauen Anamnese war es möglich, die einzelnen Studiengruppen sehr genau zu charakterisieren. Die tabellarische Charakterisierung der Studiengruppen (vgl. Tab. 7) zeigt eine gute Vergleichbarkeit der Patienten der Sepsisgruppe und der T2D-Gruppe hinsichtlich Alter und BMI, wobei die Patienten der Kontrollgruppe jünger waren und einen geringeren BMI aufwiesen. Die Patienten der Sepsisgruppe und der Kontrollgruppe

ähnelten sich hingegen im HbA<sub>1c</sub>. Die Patienten der Sepsisgruppe wiesen auf Grund ihres septischen Krankheitsgeschehens eine deutliche Erhöhung von CRP, IL-6 und Leukozytenzahl im Vergleich zu den anderen beiden Studiengruppen auf. Die in diese Studie eingeschlossenen Patienten sind trotz der vorhandenen Unterschiede zwischen den Gruppen anhand des Matchings gut vergleichbar und stellen eine repräsentative Gruppe allgemeinchirurgischer Patienten dar. Dies zeigt sich auch daran, dass die Anzahl von Patienten mit malignen Grunderkrankungen in den einzelnen Studiengruppen vergleichbar ist. Ob die Erkenntnisse, die aus dieser Arbeit gewonnen werden konnten, auf alle Sepsispatienten übertragbar sind, muss hingegen eingeschränkt betrachtet werden, da hier nur Patienten mit peritonealer Sepsis untersucht und keine Patienten mit einem anderen Sepsisfokus eingeschlossen wurden.

Zur weiteren Validierung der erhaltenen Ergebnisse konnte eine vergleichende Untersuchung von Muskelgewebe aus einem Mausmodell der peritonealen Sepsis durchgeführt werden.

Die Analyse des humanen und murinen Muskelgewebes erfolgte primär auf genomischer Ebene mittels Betrachtung der relativen mRNA-Expression unterschiedlicher Zielgene. Die Expressionsdaten zeigten erste signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen und erlaubten einen Rückschluss auf die Transkriptionsrate der Gene. Auf Grund der geringen Probenmasse des Skelettmuskelgewebes war es nicht möglich, die Menge an Zielproteinen dieser Gene auf Proteinebene zu untersuchen. Dies muss als mögliche Einschränkung der vorgelegten Arbeit benannt werden. Um dennoch valide Erkenntnisse über den Zustand der Skelettmuskulatur treffen zu können, erfolgten mehrere histologische Färbungen. Die Färbung des Makrophagen-Oberflächenproteins CD68 gilt als etablierter Nachweis von Inflammation in unterschiedlichen Geweben (Chistiakov et al. 2017) und wurde, wie in der hier vorgelegten Arbeit, auch von Puthucheary und Fink zum Nachweis von entzündetem Muskelgewebe humanen und murinen Ursprungs verwendet (Puthucheary et al. 2013, Fink et al. 2014). Die TUNEL-Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellen ist ebenfalls in unterschiedlichen Geweben etabliert und wurde bereits zum Nachweis ERS-induzierter Apoptose genutzt (Ma et al. 2008, Zhang et al. 2015). Immunhistochemischen Färbungen von CASP12 und CHOP dienten schon anderen Arbeitsgruppen zum Nachweis ERS-

bedingter Apoptose (Nakagawa et al. 2000, Nakanishi et al. 2005) und wurden daher auch in der hier vorgelegten Arbeit durchgeführt.

Durch die Zusammenstellung der Ergebnisse der molekularbiochemischen und histologischen Untersuchungen und der oben beschriebenen genauen Patientencharakterisierung konnten zahlreiche Erkenntnisse über den quergestreiften Skelettmuskel im Rahmen der peritonealen Sepsis gewonnen werden. Diese Erkenntnisse ermöglichten die Überprüfung der Arbeitshypothese.

### **5.2 Vergleichbarkeit des humanen Studienkollektives mit dem Mausmodell der peritonealen Sepsis**

Wie im Abschnitt Material und Methoden (3.3.2) beschrieben, wurden zur Validierung der humanen Daten Proben von quergestreifter Skelettmuskulatur aus einem Mausmodell der peritonealen Sepsis analysiert. Es handelte sich dabei um männliche, sechs Wochen alte C57BL/6J Mäuse. Das Verwenden von Tiermodellen ist eine anerkannte Forschungsmethode, da hier mit standardisierten Methoden Erkenntnisse gewonnen werden, die Hinweise auf die menschliche Biologie liefern können. Die Vergleichbarkeit zwischen Patienten und Tieren aus einem Mausmodell wurde in dem Vergleich der Genome der beiden Spezies bestätigt. Hier zeigte sich, dass es für etwa 99% der Mausgene ein Homolog im humanen Genom gibt (Mouse Genome et al. 2002). Außerdem zeigte der Vergleich zwischen PCI-Mäusen und pädiatrischen Sepsispatienten, dass die meisten der untersuchten in die Immunantwort involvierten Gene bei Mensch und Maus identisch sind. Die Autoren der Studie schlussfolgerten daher, dass ein solches Tiermodell der peritonealen Sepsis zur Erforschung der Diagnose und Therapie der Sepsis und zur Übertragung der Ergebnisse auf Sepsispatienten geeignet ist (Lambeck et al. 2012).

Auch in den für diese Arbeit analysierten Proben muriner und humaner Skelettmuskulatur zeigte sich in den wesentlichen Ergebnissen eine Vergleichbarkeit. Dass die Veränderungen der relativen mRNA-Expressionen zwischen der Kontrollgruppe und der jeweiligen Sepsisgruppe der beiden Spezies weitestgehend vergleichbar sind, wird in Tabelle 20 dargestellt.

**Tabelle 20:** Vergleichende Darstellung der relativen mRNA-Expression einzelner Zielgene in humanem und murinem Muskelgewebe

|        | <b>Mensch</b>                   | <b>Maus</b>       |
|--------|---------------------------------|-------------------|
|        | Sepsisgruppe vs. Kontrollgruppe | KD+Sepsis vs. KD  |
| CD68   | hochreguliert                   | hochreguliert     |
| XBP1u  | hochreguliert                   | hochreguliert     |
| XBP1s  | hochreguliert                   | hochreguliert     |
| ATF4   | nicht verändert                 | hochreguliert     |
| ATF6   | nicht verändert                 | nicht verändert   |
| BiP    | nicht verändert                 | hochreguliert     |
| GADD34 | nicht verändert                 | hochreguliert     |
| BAX    | hochreguliert                   | hochreguliert     |
| CHOP   | nicht verändert                 | herunterreguliert |
| CASP12 | nicht verändert                 | nicht verändert   |

Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen beiden Spezies ist der Umstand, dass es sich bei den Mäusen um eine sehr homogene Gruppe von Tieren gleichen Alters und Geschlechts handelt, bei denen die Sepsis durch das standardisierte PCI-Modell ausgelöst wurde und die Entnahme des Skelettmuskelgewebes zu einem frühen und gut definierten Zeitpunkt der Sepsis stattfand. Sepsispatienten stellen im Vergleich dazu im Allgemeinen eine inhomogenere Gruppe unterschiedlichen Alters und Geschlechts mit unterschiedlichen Komorbiditäten dar (Rittirsch et al. 2006). Auch die Patienten der INSIGHT-Studie waren durch unterschiedliche Erkrankungen beeinträchtigt, sodass sie trotz der vergleichbaren peritonealen Sepsis eine inhomogenere Gruppe darstellten (Tab. 6). Auch der Zeitpunkt der Organentnahme war nicht bei allen Patienten identisch. So wurde die Laparotomie bei einigen Patienten schon zu Beginn des septischen Geschehens durchgeführt, während dies bei anderen Patienten erst nach einigen Tagen intensivmedizinischer Behandlung notwendig und möglich wurde.

Da die oben demonstrierten Ergebnisse im humanen und murinen Skelettmuskel weitestgehend vergleichbar sind, kann geschlussfolgert werden, dass sich das Mausmodell der peritonealen Sepsis zur weiteren Studie der *Unfolded Protein*

*Response* im quergestreiften Skelettmuskel eignet. Ein solches Modell könnte auch zur Entwicklung von Therapien der Muskelgewebsschädigung genutzt werden. Dafür spricht auch, dass die UPR von Ma und Kollegen in einem Mausmodell der Sepsis mit den gleichen C57BL/6-Mäusen beschrieben wurde (Ma et al. 2008).

### 5.3 Erhöhte Inflammation im Skelettmuskel bei peritonealer Sepsis

In der quergestreiften Skelettmuskulatur der hier untersuchten Sepsispatienten konnte eine erhöhte inflammatorische Aktivität nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression des Entzündungsmarkers CD68 im Muskelgewebe der Sepsispatienten war signifikant höher als bei den Kontrollpatienten. Auch im Vergleich mit T2D-Patienten, deren Muskelgewebe von einer dauerhaften niedriggradigen Inflammation betroffen ist (Wu und Ballantyne 2017) blieb dieser Unterschied statistisch signifikant. Fink und Kollegen konnten in Muskelproben von T2D-Patienten und von Mäusen, die mit einer HFD gefüttert worden waren, die chronische Inflammation anhand der Anreicherung von Makrophagen in diesem Gewebe nachweisen. Dies gelang durch die Bestimmung der Genexpression des auf Makrophagen chemotaktisch wirkenden Chemokins CCL2 und durch die immunhistochemische Färbung des Makrophagen-Oberflächenproteins CD68 (Fink et al. 2014). Auch bei den Patienten der vorliegenden Arbeit wurden diese Untersuchungen durchgeführt. Die statistisch signifikant erhöhte Genexpression von CCL2 und die deutliche Anfärbbarkeit CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in den Muskelproben der Sepsispatienten sind ein weiterer Beleg für das verstärkte Entzündungsgeschehen in der Muskulatur bei peritonealer Sepsis. Bei einzelnen T2D-Patienten waren ebenso CD68<sup>+</sup>-Makrophagen im Muskelgewebe nachweisbar, die CCL2-Expression war jedoch nicht erhöht. Der Nachweis einer erhöhten Inflammation im Skelettmuskel von Patienten mit peritonealer Sepsis war ein erwartbares erstes Ergebnis dieser Arbeit. Wie bei den Patienten der INSIGHT-Studie wiesen auch Puthucheary und Kollegen die Entzündungen in der Muskulatur kritisch kranker Patienten anhand der CD68-Färbung nach. Sie demonstrierten, dass die Makrophagen-Infiltrate gemeinsam mit Nekrosen in der Muskulatur auftreten und ein Risiko für die Entwicklung einer *critical illness myopathy* darstellen (Puthucheary et al. 2013).

Die Genexpression der von den neutrophilen Granulozyten gebildeten Enzyme Myeloperoxidase und Neutrophilen-Elastase waren bei den hier untersuchten Sepsispatienten im Vergleich zu den beiden anderen Studiengruppen nicht erhöht. Dies spricht dafür, dass es in der untersuchten Skelettmuskulatur nicht zu einer vermehrten Neutrophileninfiltration kam. Die Störung der Skelettgewebshomöostase in der Sepsis zeichnete sich stattdessen wie oben beschrieben durch die Aktivität CD68<sup>+</sup>-Makrophagen aus. Die dargestellte Korrelationsanalyse (vgl. Tab. 17) zeigt zudem die statistisch signifikante Korrelation der CD68-Genexpression mit der mRNA-Expression von CCL2 innerhalb der Sepsisgruppe.

Es ist bekannt, dass das Serum von Sepsispatienten hohe IL-6-Spiegel aufweist. Diese hohen Interleukin-Spiegel sind ein Trigger der muskulären Inflammation und stellen einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer CIM und der damit verbundenen erhöhten Sterblichkeit der Patienten dar (Weber-Carstens et al. 2010). Langhans und Kollegen konnten zeigen, dass erhöhte IL-6-Serumspiegel bei Sepsispatienten die Entzündung in der quergestreiften Skelettmuskulatur durch die Induktion des Akute-Phase-Proteins Serum Amyloid A1 (SAA1) fördern. Auch die Stimulation von humanen und murinen Myozyten mit rekombinantem IL-6 zeigte eine erhöhte SAA1-Expression. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die Bedeutung von IL-6 für die Stimulation von Entzündungsreaktionen im Skelettmuskel ein über viele Arten konserviertes Phänomen ist (Langhans et al. 2014). Auch bei den hier untersuchten Patienten waren die IL-6-Serumspiegel der Sepsispatienten deutlich erhöht gegenüber denen in der Kontrollgruppe und der T2D-Gruppe (vgl. Tab. 7). Es kann in Kenntnis der oben genannten Forschungsergebnisse anderer Gruppen vermutet werden, dass auch im hier untersuchten Patientenkollektiv die erhöhten IL-6-Spiegel eine Ursache der verstärkten Inflammation im quergestreiften Skelettmuskel bei peritonealer Sepsis darstellen.

Wie oben bereits beschrieben konnten Weber-Carstens und Kollegen in ihren Studien zeigen, dass muskuläre Inflammation einen Risikofaktor für die Entwicklung der CIM darstellt und mit erhöhter Sterblichkeit von Sepsispatienten in Verbindung steht (Weber-Carstens et al. 2010). In Kenntnis dieser Assoziation von Inflammation und Sterblichkeit wurde überprüft, ob eine solche auch bei den hier untersuchten Sepsispatienten vorlag. Dazu wurden die Sepsispatienten anhand der Anfärbbarkeit CD68<sup>+</sup>-Makrophagen verglichen. Diese immunhistochemische Färbung diente dabei

als Surrogatmarker der Inflammation. Die Sterblichkeit war in der Gruppe mit stärkerer CD68-Anfärbbarkeit signifikant höher als in der Gruppe mit schwacher Färbung (vgl. Tab. 17). Die Ergebnisse zeigen damit in einer weiteren Patientenkohorte, dass Muskelgewebsinflammation ein Risikofaktor für erhöhte Sterblichkeit von Sepsispatienten ist. In nachfolgenden Studien sollte daher untersucht werden, ob die Hemmung dieser muskulären Entzündungsreaktion protektive Effekte haben und ob dies zur Reduktion der CIM und der damit verbundenen Sterblichkeit führen könnte.

### **5.4 Nachweis der *Unfolded Protein Response* im septischen Skelettmuskel**

Die oben erläuterte hochgradige Inflammation in der Skelettmuskulatur von Sepsispatienten und septischen Mäusen bestätigt den ersten Teil der hier untersuchten Arbeitshypothese. Im Weiteren stellte sich die Frage, ob die *Unfolded Protein Response* als Reaktion auf diese Inflammation im Skelettmuskel nachweisbar ist.

Es war anhand der Analyse etablierter Marker des ER-Stress-Signalweges möglich, die Aktivierung der UPR in den Proben humanen Skelettmuskels von Patienten der INSIGHT-Studie zu veranschaulichen. Diese Aktivierung zeigte sich vor allem im IRE1 $\alpha$ /XBP1-Signalweg der UPR. Die mRNA-Expressionen von XBP1u und seiner durch *Splicing* entstehenden transkriptionell aktiveren Form XBP1s waren in der Gruppe der Sepsispatienten signifikant höher als in beiden Vergleichsgruppen. Vor allem der Nachweis des *Splicings* von XBP1s und dessen vermehrte Transkription ist ein anerkanntes Signal für die Aktivierung des IRE1 $\alpha$ -Signalweges der UPR (Yoshida et al. 2001). Auch Kim und Kollegen wiesen die aktivierte UPR in humanem Muskelgewebe von Läufern anhand der vermehrten mRNA-Expression von XBP1 nach (Kim et al. 2011). Die Kerntranslokation von XBP1s, die ein zusätzlicher Hinweis für die Aktivierung des ERS-Signales ist (von Loeffelholz et al. 2017), ließ sich hingegen nur in den Muskelschnitten einzelner Sepsispatienten nachweisen und erreichte keine statistische Signifikanz. Dies könnte durch den unterschiedlichen Zeitpunkt im Verlauf der Sepsis erklärt werden, zu dem die Proben entnommen wurden. Auch die geringe Muskelmenge und das Vorhandensein von Artefakten durch das Einfrieren sind mögliche Ursachen für das Ergebnis der



immunhistochemischen Färbung. Die erhöhte mRNA-Expression von XBP1 bei den Sepsispatienten, stellt neben der Aktivierung des IRE1 $\alpha$ -Signalweges einen Hinweis dafür dar, dass auch der ATF6-Signalweg der UPR beteiligt ist. Dies erklärt sich einerseits dadurch, dass ATF6 noch vor IRE1 $\alpha$  und damit zu einem sehr frühen Zeitpunkt auf ERS reagiert (Yoshida et al. 2003, Szegezdi et al. 2006) und dass ATF6f durch Bindung an die ERSE-Region im Zellkern die Transkription von XBP1 fördert (Yoshida et al. 2001, Yamamoto et al. 2004). Bei den hier untersuchten Proben zeigten sich dennoch keine Unterschiede zwischen den Studiengruppen hinsichtlich der mRNA-Expression von ATF6. Ein Grund dafür ist, wie oben beschrieben, wahrscheinlich die frühzeitige Aktivierung dieses ERS-Sensors. Auch bei der Betrachtung von ATF4, einem weiteren Marker der UPR, zeigten sich in den humanen Studiengruppen keine Unterschiede. Wie für ATF6 beschrieben, könnte auch hier die Ursache eine frühe Aktivierung und die bereits stattgefundenene Translation sein. Ein Nachweis von ATF4 und ATF6 auf Proteinebene war nicht möglich und muss in zukünftigen Studien angestrebt werden.

Nach intensiver Literaturrecherche kann postuliert werden, dass es sich bei den hier dargestellten Ergebnissen um die erste Beschreibung der *Unfolded Protein Response* im quergestreiften Skelettmuskel von Patienten mit abdomineller Sepsis handelt. Trotz des fehlenden Nachweises der Aktivierung des ER-Stress-Signalweges auf Proteinebene stellt diese Arbeit damit eine wichtige Ergänzung zur aktuellen Forschung dar.

Zur Validierung der Ergebnisse aus dem humanen Skelettmuskel wurde zusätzlich die Skelettmuskulatur von Mäusen eines PCI-Sepsis-Modells untersucht. Hier zeigte sich wie bei den humanen Proben die Aktivierung der UPR durch die signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von Xbp1u und Xbp1s. Auch andere Arbeitsgruppen demonstrierten im Tiermodell die *Unfolded Protein Response* anhand des *Splicings* von Xbp1u zu Xbp1s. Chen und Kollegen wiesen unter anderem so die Aktivierung des ER-Stress-Signalweges im Skelettmuskel von Mäusen nach (Chen et al. 2015). Auch im Maus-Modell einer CLP-Sepsis demonstrierte die erhöhte mRNA-Expression von Xbp1s in den Milzen der betroffenen Tiere die Beteiligung des ER-Stress-Signalweges (Ma et al. 2008). Während die mRNA-Expression von Xbp1u in der Muskulatur der hier untersuchten septischen Mäuse sowohl gegenüber der KD-Gruppe als auch gegenüber der HFD-Gruppe signifikant erhöht war, war eine

solche Signifikanz bei der mRNA-Expression von Xbp1s nur im Vergleich der KD+Sepsis-Gruppe mit der KD-Gruppe nachweisbar. Eine mögliche Ursache für die relativ hohe mRNA-Expression von Xbp1s in der HFD-Gruppe ist die Aktivierung des ER-Stress-Signalweges durch die durchgeführte fettreiche Diät der Mäuse dieser Gruppe. Deldicque und Kollegen konnten in einem ähnlichen Mausmodell der HFD nachweisen, dass der ER-Stress-Signalweg im Skelettmuskel so gefütterter Tiere aktiviert wird. Neben der vermehrten mRNA-Expression von Xbp1s war hier auch eine gleichgerichtete Veränderung der Expression von Bip, Atf4 und Chop zu beobachten (Deldicque et al. 2010). Auch in der untersuchten murinen Skelettmuskulatur zeigten sich Veränderungen in der mRNA-Expression des ERS-Markers Bip. Bei den septischen Mäusen war eine signifikant erhöhte Genexpression im Vergleich zur KD-Gruppe festzustellen. Dies ist eine weitere Bestätigung der Aktivierung der UPR im SM von Mäusen dieses PCI-Modells. Auch Ma und Kollegen fanden in ihrem CLP-Mausmodell zusätzlich zur vermehrten Xbp1s-Expression eine Hochregulation des ER-Stress-Markers Bip (Ma et al. 2008).

Abweichend von den Ergebnissen im humanen SM war bei der Analyse der murinen Proben eine signifikante Erhöhung des UPR-Markers Atf4 nachweisbar. Die mRNA-Expression von Atf4 war bei den septischen Mäusen im Vergleich zu den Mäusen der anderen beiden Gruppen deutlich erhöht. Da es sich bei Atf4 um einen weiteren anerkannten Marker der UPR handelt (Harding et al. 2003), ist dies ein Beleg für die Aktivierung des von PERK regulierten Teils dieses Signalweges. PERK hemmt durch die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  einerseits die Translation der meisten Proteine, aktiviert aber andererseits Atf4 (Harding et al. 2000). Der vom ERS-Sensor PERK gesteuerte Teil des untersuchten Signalweges ist eine frühzeitige Reaktion der Zelle auf die Ansammlung fehlgefalteter Proteine im ER. Durch die Hemmung der Translation und der durch Atf4 geförderten Transkription von Genen, die das Gleichgewicht im ER wieder herstellen sollen (Scheuner et al. 2001), wirkt dieser Signalweg der UPR primär protektiv auf die Zellhomöostase (Szegezdi et al. 2006). Eine mögliche Ursache für die Unterschiede der mRNA-Expression von ATF4 im humanen und murinen Skelettmuskelgewebe könnte der Zeitpunkt der Entnahme des Muskelgewebes nach Beginn des septischen Krankheitsgeschehens sein. Während die murinen Muskeln standardisiert 24 h nach Sepsis-Induktion entnommen wurden, war dies bei den untersuchten Patienten der INSIGHT-Studie zu unterschiedlichen Zeitpunkten und teilweise erst zwei bis drei Tage nach Beginn des

septischen Krankheitsbildes im Rahmen einer indizierten Laparotomie durchgeführt wurden.

Auch die Expression von Gadd34, das als negativer Rückkopplungsmechanismus der *Unfolded Protein Response* wirkt (Ma und Hendershot 2003), wird durch Atf4 gefördert. Die Aktivierung von Gadd34 führt zur Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$  (Novoa et al. 2001) und beendet damit die durch PERK aktivierte Translationshemmung in der Zelle (Jousse et al. 2003). Im hier untersuchten Skelettmuskel septischer Mäuse konnte eine massive Erhöhung der Gadd34-mRNA-Expression im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass es in den betroffenen Muskelgeweben möglich war, dem sepsisbedingten ERS durch die *Unfolded Protein Response* entgegen zu wirken. Auch Ito und Kollegen konnten in einem Mausmodell mit LPS-Sepsis-Induktion die anti-inflammatorische und protektive Wirkung von Gadd34 zeigen (Ito et al. 2016). Da das Muskelgewebe des für diese Arbeit genutzten PCI-Tiermodells jedoch bereits nach 24 h und damit zu einem eher frühen Zeitpunkt nach PCI-Sepsis-Induktion gewonnen wurde, lässt sich nicht abschließend sagen, ob diese Beobachtung des negativen Rückkopplungsmechanismus auch bei länger anhaltender sepsisbedingter Muskelinflammation gemacht werden könnte.

Bei der Analyse humaner und muriner Gewebeproben, die für diese Arbeit zur Verfügung standen, wurde die Aktivierung der *Unfolded Protein Response* als Reaktion auf ER-Stress im septischen Skelettmuskel nachgewiesen. Ein weiterer Teil der Arbeitshypothese konnte somit bestätigt werden.

### **5.5 *Unfolded Protein Response* und die Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege**

Unterschiedliche Stressoren führen zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER. Als Reaktion auf den entstehenden ER-Stress (ERS) wird die *Unfolded Protein Response* ausgelöst. Hält der ERS über einen längeren Zeitraum an, kann sich die UPR von ihrer primär protektiven Ausrichtung zu einem pro-apoptotischen Signalweg verändern, dessen Initiierung unterschiedlicher Mediatoren bedarf.

Da die ERS-Sensoren IRE1 $\alpha$ , PERK und ATF6 nicht dazu in der Lage sind, den Zelltod direkt auszulösen, fördern sie pro-apoptotische Signalwege durch die Aktivierung von CHOP, JNK und Proteinen der Bcl-2(*B-cell-lymphoma-2*)-Familie. Der ERS-spezifischer Apoptose-Mediator CHOP nimmt dabei eine zentrale Rolle ein (Zinszner et al. 1998). Während das ATF4-Signal für die primäre Induktion von CHOP essentiell ist, trägt der IRE1 $\alpha$ -TRAF2-Komplex durch die Aktivierung der ASK1 entscheidend zur Verstärkung des Signales bei (Szegezdi et al. 2006). Ein ASK1-Mangel kann hingegen zur partiellen Apoptose-Resistenz führen (Hatai et al. 2000, Nishitoh et al. 1998). CHOP steht in enger Verbindung mit den Proteinen der Bcl-2-Familie. Es reguliert das anti-apoptotische Bcl-2 herunter und aktiviert das pro-apoptotische BAX (McCullough et al. 2001). BAX steuert die ERS-bedingte Apoptose und kann CASP12 aktivieren (Zong et al. 2003). Das Fehlen dieses Proteins schützt vor dem Zelltod (Wei et al. 2001). CASP12 wird durch ERS-bedingte Apoptose (Nakagawa et al. 2000) und den IRE1 $\alpha$ -TRAF2-Komplex aktiviert (Yoneda et al. 2001). Nakagawa und Kollegen konnten zeigen, dass CASP12-defiziente Mäuse resistent gegenüber ERS-bedingter Apoptose sind.

In Kenntnis der oben beschriebenen Signalwege, die durch die UPR ausgelöst werden können, sollten die Proben muriner und humaner Skelettmuskulatur hinsichtlich der Aktivierung ERS-bedingter Apoptose untersucht werden. Dazu wurde die relative mRNA-Expression von BAX, CHOP und CASP12 in den Geweben beider Spezies untersucht und in einer Subgruppe die Färbung apoptotischer Zellen mittels der TUNEL-Technik durchgeführt. Zusätzlich dazu erfolgte in einem Teil der humanen Muskelschnitte die immunhistochemische Färbung von CHOP und CASP12.

In den murinen Skelettmuskelproben zeigte sich eine relative Hochregulation der mRNA-Expression des pro-apoptotischen Bax. Dies stellt einen Hinweis auf die Initiation von Apoptose-Signalen dar. Auch Zhang und Kollegen konnten im septischen Myokard von Ratten eines CLP-Modells die Hochregulation von Bax nachweisen (Zhang et al. 2015), hier jedoch auf Protein-Ebene durch einen Western Blot. Dass die Aktivität von Bax in Verbindung mit dem ERS-Sensor IRE1 $\alpha$  steht, zeigten Hetz und Kollegen. Sie wiesen in einer Zellkultur nach, dass die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak (*Bcl-2 homologous antagonist killer*) einen Komplex mit IRE1 $\alpha$  bilden und dieses aktivieren können (Hetz et al. 2006). Zur

weiteren Analyse ERS-bedingter Apoptose wurden die Genexpressionsraten von Chop und Casp12 untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression von Chop in der KD+Sepsis-Gruppe im Vergleich mit den beiden anderen Gruppen des Tiermodells. Die Casp12-Genexpressionsrate war zwischen den untersuchten Gruppen des Tiermodells hingegen nicht unterschiedlich. Vor allem die signifikante Erniedrigung der Chop-mRNA-Expression spricht dafür, dass im hier untersuchten septischen Skelettmuskel des Tiermodells keine ERS-bedingte Apoptose ausgelöst wurde. Ein weiterer Hinweis dafür ist die oben beschriebene Hochregulation der mRNA-Expression von Gadd34, welches einen negativen Rückkopplungsmechanismus für das Perk/ATf4-Signal auslöst und diesen Teil der UPR damit beendet. Auch die TUNEL-Färbung muriner Skelettmuskelschnitte erbrachte keine eindeutigen Hinweise für eine verstärkte Apoptose in der KD+Sepsis-Gruppe. Es kann daher angenommen werden, dass der primär protektive Signalweg der UPR im hier untersuchten murinen Skelettmuskel des PCI-Modells erfolgreich war und eine suffiziente Proteinfaltung wieder hergestellt werden konnte. Diese Ergebnisse stehen dabei teilweise im Gegensatz zur aktuellen Forschung: Zhang und Kollegen demonstrierten die Hochregulation von Bax und wiesen außerdem eine vermehrte Proteinmenge von Chop und Casp12 im Myokard septischer Ratten eines CLP-Modells nach. In der von ihnen durchgeführten Studie war die Anzahl TUNEL<sup>+</sup>-Zellen in der Sepsisgruppe deutlich vermehrt (Zhang et al. 2015). Auch Ferlito und Kollegen zeigten im murinen CLP-Sepsismodell die Hochregulation von Chop auf mRNA- und Proteinebene, jedoch nicht im Muskelgewebe, sondern in Milz, Lunge und Leber der betroffenen Tiere (Ferlito et al. 2014). Ma und Kollegen untersuchten die Milzen von septischen Mäusen eines CLP-Modells. Sie fanden auch hier die Hochregulation von Chop auf mRNA- und Proteinebene und wiesen eine verstärkte TUNEL-Färbung nach (Ma et al. 2008). Es gibt mehrere mögliche Ursachen für die Unterschiede zwischen den beschriebenen Resultaten anderer Arbeitsgruppen und den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen. Die genannten Arbeitsgruppen führten ihre Untersuchungen nicht in Skelettmuskelgewebe durch. Nur Zhang und Kollegen zeigten die ERS-bedingte Apoptose in myokardialem Muskelgewebe von Ratten, welches sich hinsichtlich der Struktur und Funktion von Skelettmuskelgewebe unterscheidet. Die von dieser Arbeitsgruppe untersuchte septische Kardiomyopathie stellt nach aktueller Auffassung zudem eine eigene Entität der sepsisbedingten Organschädigungen dar.

Die anderen Arbeitsgruppen nutzten für ihre Analyse murines Gewebe von Milz, Lunge und Leber. Die Absicht dieser Arbeit war es hingegen, ERS im quergestreiften Skelettmuskel zu untersuchen. Außerdem verwendeten die genannten Gruppen mit dem CLP-Modell ein anderes Modell der polymikrobiellen Sepsis als das in dieser Tierstudie verwendete PCI-Modell. Obwohl beide Modelle in der Forschung etabliert sind, weisen sie Unterschiede auf. Die aus den Modellen erhaltenen Ergebnisse lassen sich nicht immer aufeinander übertragen (Seemann et al. 2017). Es besteht kein Zweifel daran, dass das hier genutzte PCI-Modell der polymikrobiellen Sepsis die Akutphase der Wirtsreaktion innerhalb der ersten 24 h sehr gut abbildet. Da die Organe der untersuchten Mäuse jedoch nach Ablauf dieser Zeit entnommen wurden, ist es nur eingeschränkt möglich, eine Aussage über den Langzeitverlauf zu treffen. Apoptotische Veränderungen im Skelettmuskel sind jedoch wahrscheinlich erst in diesem Langzeitverlauf der Sepsis zu beobachten, wenn die betroffenen Individuen die hochakute Phase überstanden haben. Da es in der Arbeitsgruppe auch möglich ist, ein PCI-Langzeitmodell der Sepsis durchzuführen (Otto et al. 2015, Chung et al. 2017), wäre dies eine sinnvolle Ergänzung zum Tiermodell der ERS-bedingten Apoptose. Hier könnte es möglich sein, die bereits erhaltenen Erkenntnisse der Aktivierung der UPR im septischen Skelettmuskel zu validieren und die Initiierung der Apoptose im Langzeitmodell zu untersuchen.

Die quergestreifte Skelettmuskulatur der Patienten der INSIGHT-Studie wurde ebenfalls im Hinblick auf die Assoziation von *Unfolded Protein Response* und der Auslösung von Apoptose untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von BAX in der Sepsisgruppe im Vergleich zu den beiden anderen Studiengruppen. Dies ist ein erster Hinweis auf die Aktivierung der Apoptose und vergleichbar mit der Erhöhung von Bax im SM der Mäuse des PCI-Tiermodells ist. Die TUNEL-Färbung repräsentativer Muskelschnitte septischer und nicht-septischer Patienten demonstrierte außerdem eine statistisch signifikant größere Anzahl TUNEL<sup>+</sup>-Muskelschnitte in der Gruppe der Sepsispatienten. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass es in der quergestreiften Skelettmuskulatur von Sepsispatienten der INSIGHT-Studie zur vermehrten Apoptose kommt und dass diese möglicherweise zur dauerhaften Schädigung des Muskelgewebes beiträgt. Die Frage, ob die oben beschriebene Aktivierung der UPR im septischen SM dieser Patienten zur Aktivierung der Apoptose beiträgt, sollte mittels der Analyse von CHOP und CASP12 beantwortet werden. Bei der Betrachtung der relativen mRNA-

Expression dieser beiden Apoptose-Marker fanden sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen der INSIGHT-Studie. Weder CHOP noch CASP12 zeigten in der Sepsisgruppe eine vermehrte Genexpression, wie sie sich bei Zhang und Kollegen im Myokard septischer Ratten darstellte (Zhang et al. 2015). Möglicherweise gelang es auf Grund der bereits stattgefundenen Translation nicht, Veränderungen in der Transkriptionsrate dieser beiden Zielgene zu finden. Ein Hinweis dafür ist die Tatsache, dass die Muskelproben bei den Studienpatienten teilweise erst im Verlauf des septischen Krankheitsgeschehens entnommen wurden. Auf Grund der geringen Probenmenge war es bei den Patienten der INSIGHT-Studie jedoch nicht möglich, CHOP und CASP12 auf Proteinebene zu untersuchen. Um dennoch eine Aussage über eine eventuell stattgefundene Aktivierung dieser beiden Apoptose-Marker treffen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen von CHOP und CASP12 in repräsentativen Muskelschnitten von Sepsispatienten und Kontrollpatienten durchgeführt. Während bei der CHOP-Färbung keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zu sehen waren, konnten bei der CASP12-Färbung Veränderungen der Signalintensität beobachtet werden. Hier zeigte sich bei den Muskelschnitten in der Subgruppe der Sepsispatienten eine vermehrte Expression von CASP12 im Vergleich mit den Muskelschnitten der Kontrollpatienten. Auch Nakanishi und Kollegen wiesen ERS-bedingte Apoptose in einer Maus-Muskelzell-Linie und Muskelgewebe von Mäusen anhand der immunhistochemischen Färbung von CASP12 nach (Nakanishi et al. 2005). Da es sich bei CASP12 um einen ER-Stress-spezifischen Apoptose-Auslöser handelt, der direkt am ER lokalisiert ist (Nakagawa et al. 2000), dient die vermehrte Anfärbbarkeit dieses Markers als deutlicher Hinweis für ERS-bedingte Apoptose im septischen Skelettmuskel der Patienten der INSIGHT-Studie. Nach umfassender Literaturrecherche kann postuliert werden, dass es sich bei den Ergebnissen dieser Arbeit um die erste Beschreibung der Assoziation von *Unfolded Protein Response* und Apoptose im quergestreiften Skelettmuskel von Sepsispatienten handelt.

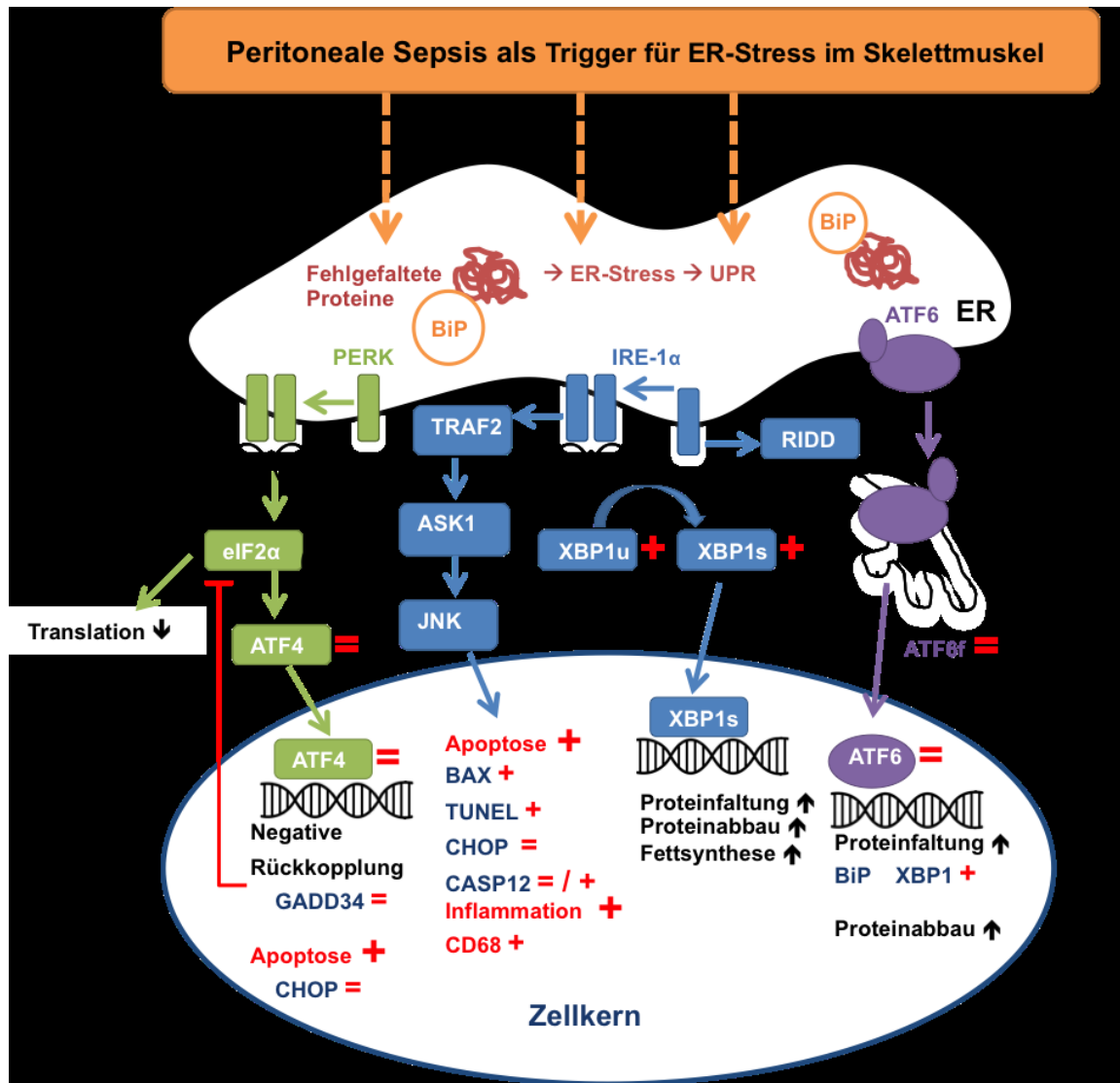
Auch die untersuchten Korrelationen zwischen sepsisbedingter Muskelinflammation und Parametern von ERS und ERS-bedingter Apoptose zeigen Hinweise dafür, dass eine Assoziation zwischen UPR und Apoptose im Skelettmuskel von Sepsispatienten vorliegt (vgl. Tab. 17). Es besteht innerhalb der Sepsisgruppe eine signifikante positive Korrelation zwischen der CD68-Genexpressionsrate, die als Surrogatmarker der Inflammation dient, und der mRNA-Expression des ERS-Markers BiP. Daraus

kann zunächst noch einmal die Verknüpfung von sepsisbedingter Inflammation und der Auslösung von ERS geschlussfolgert werden. Weitere signifikante Korrelationen konnten zwischen den Transkripten von CD68 und JNK und CD68 und CASP12 gefunden werden. Da sowohl JNK als auch CASP12 wichtige Marker der ERS-bedingten Apoptose sind, geben diese Korrelationen einen weiteren Anhaltspunkt für die Assoziation zwischen Sepsis und ERS-bedingter Apoptose im Skelettmuskel.

Obwohl im Skelettmuskelgewebe von Sepsispatienten der INSIGHT-Studie keine erhöhte Genexpressionsrate von CHOP und CASP12 nachgewiesen werden konnte, zeigten die immunhistochemischen Färbungen und die dargestellten Korrelationen eine Assoziation zwischen UPR und Apoptose im septischen Skelettmuskel. Die dieser Arbeit vorangestellte Arbeitshypothese konnte daher in weiten Teilen bestätigt werden.

Als Erweiterung der in Abbildung 2 gezeigten Aktivierung der *Unfolded Protein Response* werden die Ergebnisse dieser Arbeit im Folgenden noch einmal zusammenfassend dargestellt (Abb. 32). Gezeigt werden dabei die Ergebnisse aus dem humanen Skelettmuskel der Patienten der INSIGHT-Studie.





**Abbildung 32: Aktivierung der *Unfolded Protein Response* im Skelettmuskel von Sepsispatienten und die Assoziation mit Inflammation und Apoptose - modifiziert nach (Flamment et al. 2012, Khan et al. 2016, Wiseman et al. 2010)**

Peritoneale Sepsis führt zu Zellstress und dem vermehrten Anfall fehlgefalteter Proteine im Endoplasmatischen Retikulum und wirkt damit als Trigger für ER-Stress im Skelettmuskel. Bei Sepsispatienten der INSIGHT-Studie konnte eine vermehrte Inflammation im Muskelgewebe anhand der vermehrten mRNA-Expression und Anfärbbarkeit von CD68 nachgewiesen werden. Die Aktivierung der UPR zeigte sich durch eine vermehrte mRNA-Expression von XBP1u und XBP1s, während die Expression von ATF4 und ATF6 nicht verändert war. Daraus schlussfolgerten wir, dass vor allem der IRE1α-Weg der UPR aktiv war. Im untersuchten Muskelgewebe konnte durch die TUNEL-Färbung und die vermehrte mRNA-Expression von BAX eine erhöhte Apoptose nachgewiesen werden. Während die ERS-spezifischen Apoptose-Mediatoren CHOP und CASP12 keine transkriptionellen Veränderungen in der Gruppe der Sepsispatienten aufwiesen, zeigte die CASP12-Färbung eine verstärkte Signalintensität im septischen Muskelgewebe. Die Ergebnisse dieser Färbung und weitere signifikante Korrelationen zwischen CASP12 und anderen Mediatoren der Inflammation und der UPR konnten als starke Hinweise dafür interpretiert werden, dass die UPR zur Apoptose im Skelettmuskelgewebe von Sepsispatienten beiträgt. (Gesteigerte mRNA-Expression wird durch + symbolisiert; = symbolisiert keine Veränderung. Gestrichelte Pfeile verdeutlichen integrative Prozesse und multiple Stressoren, durch die Sepsis die UPR auslösen kann.)

## **5.6 *Unfolded Protein Response* und ihre Assoziation mit sepsisbedingter Muskelgewebsschädigung**

Es konnte bisher dargelegt werden, dass bei Patienten mit peritonealer Sepsis eine erhöhte Inflammation im quergestreiften Skelettmuskel resultiert und dass als Reaktion auf ERS die *Unfolded Protein Response* ausgelöst wird. Zudem konnten einige Hinweise für die Induktion ERS-bedingter Apoptose im Muskelgewebe der Patienten der INSIGHT-Studie dargestellt werden. Es kann daher angenommen werden, dass der ER-Stress-Signalweg in der Pathogenese der *critical illness myopathy* bei Patienten mit peritonealer Sepsis beteiligt ist. Die CIM, die als eine wichtige und folgenschwere Komplikation der Sepsis gilt (Schefold et al. 2010), steht in Verbindung mit allgemeiner sepsisbedingter Proteindegradation (Klaude et al. 2007) und speziell dem Verlust von Muskel-Myosin durch verminderte Synthese und vermehrte Degradation (Wollersheim et al. 2014).

In der Muskulatur kritisch kranker Patienten, die von einer CIM betroffen sind, ist diese Proteindegradation schon frühzeitig im Verlauf der Sepsis zu beobachten (Hasselgren et al. 2005). Die Reduktion der Muskelmasse und der oft auftretende Gewichtsverlust führen einerseits zur erschwerten Entwöhnung vom Respirator (De Jonghe et al. 2002) und andererseits zu Einschränkungen der Mobilität auch noch Jahre nach der Entlassung aus dem Krankenhaus (Herridge et al. 2011). Um diesem Proteinverlust und der katabolen Stoffwechsellage kritisch kranker Patienten entgegenzuwirken, wird unter anderem gefordert, die betroffenen Patienten mit einer proteinangereicherten Ernährung zu versorgen (Weijs et al. 2012). Allingstrup und Kollegen konnten in ihrer Studie allerdings keinen messbaren Vorteil für Patienten mit einer frühzeitig hohen Proteinzufuhr bis zu 1,5 g/kg/d nachweisen (Allingstrup et al. 2017). Die Tatsache, dass eine erhöhte Proteinzufuhr das *Outcome* der Patienten nicht deutlich verbessern kann, weist auf eine intrazelluläre Störung der Proteinverwertung hin. Die im Verlauf der *Unfolded Protein Response* auftretende Störung des Proteinstoffwechsels mit Proteindegradation und verminderter Proteinsynthese (Schröder und Kaufman 2005) könnte eine mögliche Ursache dieser Proteinverwertungsstörung sein. Dies kann daher als ein weiterer Hinweis für die Assoziation zwischen ERS-Signalweg und der Pathophysiologie der *critical illness myopathy* betrachtet werden.

Die oft auch nach der Akutphase der Sepsis anhaltende katabole Stoffwechsellage beeinträchtigt die betroffenen Patienten und verhindert, dass sich die Funktion des Skelettmuskels wieder ausreichend restituieren kann. Patienten, die nach der Akutphase der Sepsis noch länger als 14 Tage auf der Intensivstation behandelt werden müssen, werden als chronisch-kritisch-krank (CCI, *chronic critically ill*) Patienten bezeichnet (Mira et al. 2017). Diese Patienten leiden häufig unter einem Symptomkomplex, der als *Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome (PICS*, persistierende Inflammation, Immunsuppression und Katabolie) bezeichnet wird (Gentile et al. 2012). Das PICS geht unter anderem mit erhöhter Proteinkatabolie und gesteigertem Verlust der Skelettmuskulatur einher, prädisponiert die betroffenen Patienten für eine erneute Infektion und führt zu erhöhter Langzeitsterblichkeit (Mira et al. 2017). Die *Unfolded Protein Response*, die zur gesteigerten Proteindegradation führt, könnte eine Ursache des PICS auf zellulärer Ebene sein.

Hyperglykämie und Insulinresistenz treten im Verlauf der Sepsis häufig auf (Leonidou et al. 2008) und stellen neben der Inflammation einen weiteren Risikofaktor für die Entwicklung einer CIM dar (Weber-Carstens et al. 2010). Es wurde daher untersucht, ob es auch bei den Sepsis-Patienten der INSIGHT-Studie Veränderungen im Glukose-Metabolismus gab, die als Risikofaktor der Muskelgewebsschädigung wirken konnten. Die mRNA-Expression von GLUT4, dem Insulin-abhängigen Glukosetransporter des Muskels, war im Skelettmuskelgewebe der untersuchten Sepsispatienten signifikant niedriger als im Muskelgewebe von Kontrollpatienten. Dass eine reduzierte Genexpression von GLUT4 bei CIM-Patienten auftritt, konnten auch Weber-Carstens und Kollegen zeigen. Sie wiesen neben der verringerten Transkriptmenge auch eine gestörte Translokation von GLUT4 an die Zellmembran nach (Weber-Carstens et al. 2013). Da die GLUT4-Translokation durch das Binden von Insulin an die Muskelzelle ausgelöst wird, ist die Störung dieses Ablaufes als zentrales molekulares Pendant der skelettmuskulären Insulinresistenz im septischen Krankheitsgeschehen zu interpretieren. Diese Befunde sind kongruent mit den signifikant erhöhten HOMA-IR-Werten in der Gruppe der Sepsispatienten und reflektieren somit die bekannte quantitative Bedeutung der Skelettmuskulatur im Kontext der mittels HOMA-IR erfassten Ganzkörper-Insulinresistenz.

## Diskussion

Diese Ergebnisse ergänzen damit die aktuelle Forschung. Zusätzlich zur Bestimmung der mRNA-Expression von GLUT4 wäre es sinnvoll, in den Muskelschnitten der Patienten der INSIGHT-Studie eine Färbung dieses Glukosetransporters durchzuführen, um zu überprüfen ob auch bei diesen Patienten eine Störung der GLUT4-Translokation vorlag.

Es wurde zudem überprüft, ob es eine Korrelation der GLUT4-Genexpressionsrate mit anderen Transkripten der Inflamationsreaktion und der *Unfolded Protein Response* in der Gruppe der Sepsispatienten der INSIGHT-Studie gab (vgl. Tab. 19). Es zeigte sich bei dieser Analyse eine statistisch signifikante Korrelation der mRNA-Expression von GLUT4 mit den Genexpressionsraten von CD68 und CCL2, die als Marker der Inflammation im Skelettmuskel gelten. Dieses zu erwartende Ergebnis konnte durch den Nachweis der Korrelation von GLUT4 mit Markern der UPR ergänzt werden. Die mRNA-Expression von GLUT4 korrelierte statistisch signifikant mit der Genexpressionsrate der UPR-Marker BiP und GADD34.

Die dargestellten Korrelationen demonstrieren den Zusammenhang zwischen der UPR und der sepsisbedingten Störung des Glukosemetabolismus. Die bereits durch unterschiedliche Arbeitsgruppen gewonnene Erkenntnis, dass die UPR eine Rolle in der Entwicklung von Diabetes und Übergewicht bei nicht-septischen Patienten spielt (Cnop et al. 2012), stellt neben den gezeigten Korrelationen einen weiteren Hinweis für die Beteiligung der UPR in der Pathogenese der Stresshyperglykämie dar.

Mit den präsentierten Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es Assoziationen zwischen der *Unfolded Protein Response* und der Apoptose im septischen Skelettmuskel einerseits und andererseits auch mit der sepsisbedingten Stresshyperglykämie gibt. Daher kann angenommen werden, dass die Mediatoren der UPR interessante Targets für die Diagnose und Therapie sepsisbedingter Muskelgewebsschädigungen darstellen.

Andere Arbeitsgruppen konnten bereits nachweisen, dass Veränderungen dieser Mediatoren bei unterschiedlichen Erkrankungen relevant sind. Die selektive Inhibition von eIF2 $\alpha$  schützt beispielsweise Zellen vor der Entwicklung von ER-Stress (Boyce et al. 2005). In einem Mausmodell des Morbus Parkinson konnte gezeigt werden, dass CHOP ein Mediator der Apoptose in der Substantia nigra ist und dass die

CHOP-Deletion vor Parkinson schützen kann (Silva et al. 2005). Veränderungen im CHOP-Gen führten im Mausmodell außerdem zu einer verzögerten Entwicklung des Diabetes mellitus (Oyadomari et al. 2002). Im Muskelgewebe eines Mausmodells der Duchenne-Muskelatrophie wurde die UPR als Target ebenfalls untersucht. Hier führte eine Hemmung von CASP12 zum Schutz der Muskelfunktion (Moorwood und Barton 2014). Auch Veränderungen des IRE1 $\alpha$ -XBP1-Weges der *Unfolded Protein Response* werden als therapeutische Möglichkeit für verschiedene Erkrankungen diskutiert (Jiang et al. 2015). Unterschiedliche Arbeitsgruppen beschrieben den Zusammenhang von Sepsis und der Aktivierung des ER-Stress-Signalweges (Khan et al. 2016) und untersuchten, ob Veränderungen der UPR-Mediatoren einen Einfluss auf das septische Krankheitsgeschehen haben könnten. So wiesen Saleh und Kollegen nach, dass Casp12-Knockout-Mäuse vor Peritonitis und septischem Schock geschützt sind (Saleh et al. 2006). Auch Chop-Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein verbessertes Überleben im CLP-Sepsis-Modell (Ferlito et al. 2014). Die Hemmung des ER-Stress-Signalweges führte zudem zur Reduktion der Inflammation von Lungengewebe in einem LPS-Sepsis-Modell (Kim et al. 2013).

Ob die Hemmung einzelner UPR-Mediatoren auch zu einer geringeren sepsisbedingten Muskelgewebsschädigung führen, wurde bis jetzt nicht untersucht. Die Erkenntnisse dieser Arbeit können jedoch als Grundlage für weitere Studien auf diesem Gebiet dienen.

### 6 Schlussfolgerung

Als wesentliches Ziel dieser Arbeit sollte das Auftreten von ER-Stress und die Aktivierung der *Unfolded Protein Response* im Skelettmuskel von Patienten mit peritonealer Sepsis systematisch untersucht werden. Es sollte die Hypothese überprüft werden, dass Sepsis einerseits mit erhöhter Inflammation und der Auslösung von ER-Stress im Muskelgewebe assoziiert ist und dass die pro-apoptotischen Signalwege der UPR andererseits zur sepsisbedingten Schädigung der Skelettmuskulatur beitragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen die erhöhte Inflammation im Skelettmuskel von Patienten mit abdomineller Sepsis und von Mäusen eines confirmatorischen Tiermodells nach. Weiterhin gelang die erste Beschreibung der Aktivierung der *Unfolded Protein Response* im Muskelgewebe von Sepsispatienten. Die vermehrte Apoptose im septischen Skelettmuskel und die Assoziationen zwischen Mediatoren der UPR und dieser beobachteten Apoptose bestärkten die Annahme, dass der ER-Stress-Signalweg zur sepsisbedingten Schädigung der Muskulatur beiträgt. Dennoch war es nicht möglich, die ER-Stress-bedingte Apoptose anhand der Aktivierung sämtlicher dafür zuständiger Mediatoren darzustellen. Neben der erhöhten Inflammation konnte im Skelettmuskel auch ein gestörter Glukosemetabolismus nachgewiesen werden, welcher ebenfalls die Entwicklung von Muskelgewebsschädigungen fördert.

Da in dieser Arbeit die Aktivierung der *Unfolded Protein Response* im septischen Skelettmuskel dargestellt werden konnte, sollten in zukünftigen Studien die beteiligten ER-Stress-Sensoren und die durch sie ausgelösten Signalwege näher untersucht werden. In diesen Folgestudien könnte zum Beispiel anhand eines größeren Patientenkollektives der kausale Nachweis ERS-bedingter Apoptose im Skelettmuskel gelingen. Dafür wäre im Vergleich zur hier vorgelegten Arbeit die Analyse der beteiligten Mediatoren nicht nur auf transkriptioneller, sondern auch auf Proteinebene erforderlich. Es könnte in einer solchen klinischen Studie außerdem interessant sein, die Muskelgewebsschädigung sowohl durch biochemische Methoden als auch anhand von klinischen und sonografischen Untersuchungen zur Quantifizierung der *critical illness myopathy* nachzuweisen. Da auch ein gestörter Glukosemetabolismus als Risikofaktor der Entwicklung der CIM gilt (Weber-Carstens et al. 2010), sollte in einer zukünftigen Studie auf die Vergleichbarkeit der

## Schlussfolgerung

eingeschlossenen Sepsispatienten hinsichtlich des Grades ihrer Stresshyperglykämie geachtet werden.

Auch im PCI-Modell der polymikrobiellen Sepsis sollte die Aktivierung des ER-Stress-Signalweges und die Auslösung von Apoptose in der Muskulatur weiter untersucht werden. Dieses Modell ist wie bereits dargestellt prinzipiell zur Studie sepsisbedingter Muskelgewebsschädigungen geeignet. In Erweiterung des hier genutzten Tiermodells könnte außerdem überprüft werden, ob sich die Hemmung einzelner Mediatoren der *Unfolded Protein Response* protektiv auf die Muskulatur und das Sepsis-Überleben auswirken würde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können daher als Ausgangspunkt für die weitere Untersuchung der *Unfolded Protein Response* und der ER-Stress-bedingten Apoptose im Skelettmuskel von Sepsispatienten dienen und möglicherweise zur Klärung der Pathogenese der *critical illness myopathy* beitragen.

## 7 Literaturverzeichnis

- ADA. 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 33 Suppl 1 (Supplement\_1):S62-69.
- Allingstrup MJ, Kondrup J, Wiis J, Claudius C, Pedersen UG, Hein-Rasmussen R, Bjerregaard MR, Steensen M, Jensen TH, Lange T, Madsen MB, Møller MH, Perner A. 2017. Early goal-directed nutrition versus standard of care in adult intensive care patients: the single-centre, randomised, outcome assessor-blinded EAT-ICU trial. *Intensive Care Medicine*, 43 (11):1637-1647.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 2004. Normalization of Real - Time Quantitative Reverse Transcription - PCR Data : A Model - Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization , Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64:5245-5245.
- Bagshaw SM, Lapinsky S, Dial S, Arabi Y, Dodek P, Wood G, Ellis P, Guzman J, Marshall J, Parrillo JE, Skrobik Y, Kumar A. 2009. Acute kidney injury in septic shock: Clinical outcomes and impact of duration of hypotension prior to initiation of antimicrobial therapy. *Intensive Care Medicine*, 35 (5):871-881.
- Baumann O, Walz B. 2001. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *International Review of Cytology*, 205:149-214.
- Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW. 2009. RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *Biospektrum - Special RNA Technologien*, 5:512-515.
- Bercker S, Weber-Carstens S, Deja M, Grimm C, Wolf S, Behse F, Busch T, Falke KJ, Kaisers U. 2005. Critical illness polyneuropathy and myopathy in patients with acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine*, 33 (4):711-715.
- Bergeron JJM, Brenner MB, Thomas DY, Williams DB. 1994. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends in Biochemical Sciences*, 19 (3):124-128.
- Berridge MJ. 2002. The endoplasmic reticulum: A multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32 (5-6):235-249.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, 2 (6):326-332.
- Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH, West AB, Ron D. 2001. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 $\beta$ -deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 107 (5):585-593.
- Bierbrauer J, Koch S, Olbricht C, Hamati J, Lodka D, Schneider J, Luther-Schröder A, Kleber C, Faust K, Wiesener S, Spies CD, Spranger J, Spuler S, Fielitz J, Weber-Carstens S. 2012. Early type II fiber atrophy in intensive care unit patients with nonexcitable muscle membrane. *Critical Care Medicine*, 40 (2):647-650.
- Bolton CF, Gilbert JJ, Hahn AF, Sibbald WJ. 1984. Polyneuropathy in critically ill patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 47:1223-1231.
- Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J. 2005. A selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science (New York, NY)*, 307 (5711):935-939.
- Callahan LA, Supinski GS. 2009. Sepsis-induced myopathy. *Critical Care Medicine*, 37 (10 0):S354-S367.



- Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. 1994. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (9):3652-3656.
- Chen D, Wang Y, Chin ER. 2015. Activation of the endoplasmic reticulum stress response in skeletal muscle of G93A\*SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9 (May):1-14.
- Chen X, Shen J, Prywes R. 2002. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the er to the Golgi. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (15):13045-13052.
- Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. 2017. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*, 97 (1):4-13.
- Chitnis NS, Pytel D, Bobrovnikova-Marjon E, Pant D, Zheng H, Maas NL, Frederick B, Kushner JA, Chodosh LA, Koumenis C, Fuchs SY, Diehl JA. 2012. MiR-211 Is a Prosurvival MicroRNA that Regulates chop Expression in a PERK-Dependent Manner. *Molecular Cell*, 48 (3):353-364.
- Chung HY, Witt CJ, Jbeily N, Hurtado-Oliveros J, Giszas B, Lupp A, Gräler MH, Bruns T, Stallmach A, Gonnert FA, Claus RA. 2017. Acid Sphingomyelinase Inhibition Prevents Development of Sepsis Sequelae in the Murine Liver. *Scientific Reports*, 7 (1):1-12.
- Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. 2012. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine*, 18 (1):59-68.
- Cohen J, Vincent JL, Adhikari NKJ, Machado FR, Angus DC, Calandra T, Jaton K, Giulieri S, Delaloye J, Opal S, Tracey K, van der Poll T, Pelfrene E. 2015. Sepsis: A roadmap for future research. *The Lancet Infectious Diseases*, 15 (5):581-614.
- Cox JS, Shamu CE, Walter P. 1993. Transcriptional Induction of Genes Encoding Endoplasmic-Reticulum Resident Proteins Requires a Transmembrane Protein-Kinase. *Cell*, 73 (6):1197-1206.
- De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur JP, Authier FJ, Durand-Zaleski I, Boussarsar M, Cerf C, Renaud E, Mesrati F, Carlet J, Raphael JC, Qutin H, Bastuji-Garin S. 2002. Paresis Acquired in the Intensive Care Unit. *Jama*, 288 (22):2859-2867.
- Deldicque L, Cani PD, Philp A, Raymackers JM, Meakin PJ, Ashford MLJ, Delzenne NM, Francaux M, Baar K. 2010. The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 299 (5):E695-E705.
- Dhainaut J-F, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. 2001. Hepatic response to sepsis: Interaction between coagulation and inflammatory processes. *Critical Care Medicine*, 29 (7):S42-S47.
- Ferlito M, Wang Q, Fulton WB, Colombani PM, Marchionni L, Fox-Talbot K, Paolocci N, Steenbergen C. 2014. H2S Increases Survival during Sepsis: Protective Effect of CHOP Inhibition. *The Journal of Immunology*, 192 (4):1806-1814.
- Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL. 2001. The Action of Molecular Chaperones in the Early Secretory Pathway. *Annual Review of Genetics*, 35 (1):149-191.
- Fink LN, Costford SR, Lee YS, Jensen TE, Bilan PJ, Oberbach A, Blüher M, Olefsky JM, Sams A, Klip A. 2014. Pro-Inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-Fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans. *Obesity*, 22 (3):747-757.

- Flamment M, Hajdуч E, Ferré P, Foufelle F. 2012. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23 (8):381-390.
- Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. 2016a. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Deutsches Arzteblatt International*, 113 (10):159-166.
- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. 2016b. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193 (3):259-272.
- Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendrycx S, Caron C, Rime A, Marey A, Lestavel P. 1992. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation; Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest*, 101 (3):816-823.
- Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, Sommer T. 2000. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, 2 (7):379-384.
- Gardner BM, Walter P. 2011. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science (New York, NY)*, 333 (6051):1891-1894.
- Gentile LF, Cuenca AG, Efron Pa, Ang D, Bihorac A, McKinley BA, Moldawer LL, Moore FA. 2012. Persistent inflammation and immunosuppression. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 72 (6):1491-1501.
- Gething M-J, Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature*, 355 (6355):33-45.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Lösche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *Journal of Surgical Research*, 170 (1):123-134.
- Griffiths G, Warren G, Quinn P, Mathieu-Costello O, Hoppeler H. 1984. Density of newly synthesized plasma membrane proteins in intracellular membranes. I. Stereological studies. *The Journal of cell biology*, 98 (6):2133-2141.
- Grimm A, Teschner U, Porzelius C, Ludewig K, Zielske J, Witte OW, Brunkhorst FM, Axer H. 2013. Muscle ultrasound for early assessment of critical illness neuromyopathy in severe sepsis. *Critical Care*, 17 (5).
- Groenendyk J, Michalak M. 2005. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochimica Polonica*, 52 (2):381-395.
- Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS. 2016. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 16 (8):469-484.
- Häcki J, Egger L, Monney L, Conus S, Rossé T, Fellay I, Borner C. 2000. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene*, 19 (19):2286-2295.
- Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ. 2013. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature Cell Biology*, 15 (5):481-490.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397 (6716):271-274.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*, 6 (5):1099-1108.

- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*, 11 (3):619-633.
- Hasselgren PO, Menconi MJ, Fareed MU, Yang H, Wei W, Evenson A. 2005. Novel aspects on the regulation of muscle wasting in sepsis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37 (10 SPEC. ISS.):2156-2168.
- Hatai T, Matsuzawa A, Inoshita S, Mochida Y, Kuroda T, Sakamaki K, Kuida K, Yonehara S, Ichijo H, Takeda K. 2000. Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (34):26576-26581.
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. 1999. Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology of the Cell*, 10 (11):3787-3799.
- Helliwell TR, Wilkinson A, Griffiths RD, McClelland P, Palmer TEA, Bone JM. 1998. Muscle fibre atrophy in critically ill patients is associated with the loss of myosin filaments and the presence of lysosomal enzymes and ubiquitin. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 24 (6):507-517.
- Hermans G, Van Mechelen H, Clerckx B, Vanhullebusch T, Mesotten D, Wilmer A, Casaer MP, Meersseman P, Debaveye Y, Van Cromphaut S, Wouters PJ, Gosselink R, Van Den Berghe G. 2014. Acute outcomes and 1-year mortality of intensive care unit-acquired weakness: A cohort study and propensity-matched analysis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190 (4):410-420.
- Herridge MS, Tansey CM, Matté A, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Cooper A, Guest CB, Mazer CD, Mehta S, Stewart TE, Kudlow P, Cook D, Slutsky AS, Cheung AM. 2011. Functional Disability 5 Years after Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 364 (14):1293-1304.
- Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee A-H, Bassik MC, Antonsson B, Brandt GS, Iwakoshi NN, Schinzel A, Glimcher LH, Korsmeyer SJ. 2006. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science (New York, NY)*, 312 (5773):572-576.
- Hollien J, Weissman JS. 2006. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science*, 313 (5783):104-107.
- Horn P, Metzger UB, Steidl R, Romeike B, Rauchfuss F, Sponholz C, Thomas-Ruddel D, Ludewig K, Birkenfeld AL, Settmacher U, Bauer M, Claus RA, von Loeffelholz C. 2016. Chemerin in peritoneal sepsis and its associations with glucose metabolism and prognosis: a translational cross-sectional study. *Crit Care*, 20:39.
- Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. 2006. Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1- Mediated NF- $\kappa$ B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression. *Society*, 26 (8):3071-3084.
- Hubbard SC, Ivatt RJ. 1981. Synthesis and Processing of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*, 50 (1):555-583.
- Ito S, Tanaka Y, Oshino R, Okado S, Hori M, Isobe KI. 2016. GADD34 suppresses lipopolysaccharide-induced sepsis and tissue injury through the regulation of macrophage activation. *Cell Death and Disease*, 7 (5):e2219-e2219.

- Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. 2010. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *Journal of the American Medical Society*, 304 (16):1787-1794.
- Jian B, Hsieh C-H, Chen J, Choudhry M, Bland K, Chaudry I, Raju R. 2008. Activation of endoplasmic reticulum stress response following trauma-hemorrhage. *Biochimica et biophysica acta*, 1782 (11):621-626.
- Jiang D, Niwa M, Koong AC. 2015. Targeting the IRE1 $\alpha$ -XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases. *Seminars in Cancer Biology*, 33:48-56.
- Jousse C, Oyadomari S, Novoa I, Lu P, Zhang Y, Harding HP, Ron D. 2003. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 $\alpha$  phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *Journal of Cell Biology*, 163 (4):767-775.
- Katayama T, Imaizumi K, Honda A, Yoneda T, Kudo T, Takeda M, Mori K, Rozmahel R, Fraser P, St. George-Hyslop P, Tohyama M. 2001. Disturbed Activation of Endoplasmic Reticulum Stress Transducers by Familial Alzheimer's Disease-linked Presenilin-1 Mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (46):43446-43454.
- Khan J, Harrison TB, Rich MM, Moss M. 2006. Early development of critical illness myopathy and neuropathy in patients with severe sepsis. 1421-1425.
- Khan MM, Yang W-L, Wang P. 2016. Endoplasmic reticulum stress in sepsis. *Shock*, 44 (4):294-304.
- Kim HJ, Jeong JS, Kim SR, Park SY, Chae HJ, Lee YC. 2013. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  signaling pathway. *Scientific Reports*, 3 (1):1142-1142.
- Kim HJ, Jamart C, Deldicque L, An G-L, Lee YH, Kim CK, Raymackers J-M, Francaux M. 2011. Endoplasmic Reticulum Stress Markers and Ubiquitin-Proteasome Pathway Activity in Response to a 200-km Run. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 43 (1):18-25.
- Klaude M, Fredriksson K, Tjäder I, Hammarqvist F, Ahlman B, Rooyackers O, Wernerman J. 2007. Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. *Clinical Science*, 112 (9):499-506.
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. 1985. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 13 (10):818-829.
- Korošec Jagodič H, Jagodič K, Podbregar M. 2006. Long-term outcome and quality of life of patients treated in surgical intensive care: A comparison between sepsis and trauma. *Critical Care*, 10 (5):1-7.
- Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething M-J, Sambrook J. 1988. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins
- Kumar R, Azam S, Sullivan JM, Owen C, Cavener DR, Zhang P, Ron D, Harding HP, Chen JJ, Han a, White BC, Krause GS, DeGracia DJ. 2001. Brain ischemia and reperfusion activates the eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase, PERK. *Journal of neurochemistry*, 77 (5):1418-1421.
- Lambeck S, Weber M, Gonnert FA, Mrowka R, Bauer M. 2012. Comparison of Sepsis-Induced Transcriptomic Changes in a Murine Model to Clinical Blood Samples Identifies Common Response Patterns. *Frontiers in Microbiology*, 3 (September):1-7.
- Lang CH, Frost RA, Vary TC. 2007. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293:E453-459.

- Langhans C, Weber-Carstens S, Schmidt F, Hamati J, Kny M, Zhu X, Wollersheim T, Koch S, Krebs M, Schulz H, Lodka D, Saar K, Labeit S, Spies C, Hubner N, Spranger J, Spuler S, Boschmann M, Dittmar G, Butler-Browne G, Mouly V, Fielitz J. 2014. Inflammation-induced acute phase response in skeletal muscle and critical illness myopathy. *PLoS ONE*, 9 (3):1-11.
- Latronico N, et al. 1996. Critical Illness Myopathy and Neuropathy. *The Lancet*, 347 (Cim):1579-1582.
- Latronico N, Bolton CF. 2011. Critical illness polyneuropathy and myopathy: A major cause of muscle weakness and paralysis. *The Lancet Neurology*, 10 (10):931-941.
- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. 1993. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*, 270 (24):2957-2963.
- Leonidou L, Michalaki M, Leonardou A, Polyzogopoulou E, Fouka K, Gerolymos M, Leonardos P, Psirogiannis A, Kyriazopoulou V, Gogos CA. 2008. Stress-induced hyperglycemia in patients with severe sepsis: A compromising factor for survival. *American Journal of the Medical Sciences*, 336 (6):467-471.
- Lund S, Holmang GD. 1995. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Biochemistry*, 92 (June):5817-5821.
- Ma T, Han L, Gao Y, Li L, Shang X, Hu W, Xue C. 2008. The endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signal pathway is involved in sepsis-induced abnormal lymphocyte apoptosis. *European Surgical Research*, 41 (2):219-225.
- Ma Y, Hendershot LM. 2003. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (37):34864-34873.
- Ma Y, Hendershot LM. 2004. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28 (1-2):51-65.
- Malhi H, Kaufman RJ. 2011. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Journal of Hepatology*, 54 (4):795-809.
- Martinez IM. 2003. Genomic Analysis of the Unfolded Protein Response in Arabidopsis Shows Its Connection to Important Cellular Processes. *the Plant Cell Online*, 15 (2):561-576.
- Marzec M, Eletto D, Argon Y. 2012. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823 (3):774-787.
- Matthay MA, Zemans RL. 2011. The Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathogenesis and Treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6 (1):147-163.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski aS, Naylor Ba, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28 (7):412-419.
- Mayer P, Gierke H. 1891. Färben mit Hämatoxylin. *Mitt Zool Stat Neapel*, (10):170-186.
- McCullough KD, Martindale JL, Aw T-y, Holbrook NJ, Cullough KDMC, Klotz L-o. 2001. Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and

- Perturbing the Cellular Redox State. *Molecular and Cellular Biology*, 21 (4):1249-1259.
- Michalak M, Corbett EF, Mesaeri N, Nakamura K, Opas M. 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *The Biochemical journal*, 344 Pt 2:281-292.
- Mira JC, Brakenridge SC, Moldawer LL, Moore FA. 2017. Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *Critical Care Clinics*, 33 (2):245-258.
- Moorwood C, Barton ER. 2014. Caspase-12 ablation preserves muscle function in the mdx mouse. *Human molecular genetics*, 23 (20):5325-5341.
- Mouse Genome S, Chinwalla AT, Cook LL, Delehaunty KD, Fewell GA, Fulton LA, Fulton RS, Graves TA, Hillier LW, Mardis ER, McPherson JD, Miner TL, Nash WE. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420 (6915):520-562.
- Munro S, Pelham HRB. 1986. An hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, 46 (2):291-300.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature*, 403 (6765):98-103.
- Nakanishi K, Sudo T, Morishima N. 2005. Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *Journal of Cell Biology*, 169 (4):555-560.
- National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106 (25):3143-3421.
- Nichols BA, Ford Bainton D, Farquhar MG. 1971. Differentiation of monocytes: Origin, nature, and fate of their azurophil granules. *Journal of Cell Biology*, 50 (2):498-515.
- Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo H. 1998. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Molecular Cell*, 2 (3):389-395.
- Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *The Journal of cell biology*, 153 (5):1011-1022.
- Oda Y, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. 2006. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *Journal of Cell Biology*, 172 (3):383-393.
- Otto GP, Grünwald B, Geis C, Köthe S, Hurtado-Oliveros J, Chung HY, Ekaney M, Bockmeyer CL, Sossdorf M, Busch M, Claus RA. 2015. Impact of antibiotic treatment intensity on long-term sepsis-associated kidney injury in a polymicrobial peritoneal contamination and infection model. *Nephron*, 129 (2):137-142.
- Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M. 2002. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 109 (4):525-532.

- Palam LR, Baird TD, Wek RC. 2011. Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (13):10939-10949.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9):45e-45.
- Pincus D, Chevalier MW, Aragón T, van Anken E, Vidal SE, El-Samad H, Walter P. 2010. BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biology*, 8 (7).
- Puthucherry ZA, Rawal J, McPhail M, Connolly B, Ratnayake G, Chan P, Hopkinson NS, Padhke R, Dew T, Sidhu PS, Velloso C, Seymour J, Agley CC, Selby A, Limb M, Edwards LM, Smith K, Rowlerson A, Rennie MJ, Moxham J, Harridge SDR, Hart N, Montgomery HE. 2013. Acute Skeletal Muscle Wasting in Critical Illness. *Jama*, 310 (15):1591-1591.
- Quartin AA. 1997. Magnitude and Duration of the Effect of Sepsis on Survival. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 277 (13):1058-1058.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE. 2010. Prevention , diagnosis , therapy and follow-up care of sepsis : 1 st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society ( Deutsche Sepsis-Gesellschaft e . V . ( DSG )) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medi. *German Medical Science*, 8:1-86.
- Rich MM, Bird SJ, Raps EC, McCluskey LF, Teener JW. 1997. Direct muscle stimulation in acute quadriplegic myopathy. *Muscle and Nerve*, 20 (6):665-673.
- Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. 2006. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*, 81 (1):137-143.
- Rodriguez J, Gilson Hln, Jamart Cc, Naslain D, Pierre N, Deldicque L, Francaux M. 2015. Pomegranate and green tea extracts protect against ER stress induced by a high-fat diet in skeletal muscle of mice. *European Journal of Nutrition*, 54 (3):377-389.
- Ron D, Walter P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8 (7):519-529.
- Rudiger A, Singer M. 2013. The heart in sepsis: from basic mechanisms to clinical management. *Current vascular pharmacology*, 11 (2):187-195.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ. 2004. A trip to the ER: Coping with stress. *Trends in Cell Biology*, 14 (1):20-28.
- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Akha AAS, Raden D, Kaufman RJ. 2006. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biology*, 4 (11):2024-2041.
- Sado M, Yamasaki Y, Iwanaga T, Onaka Y, Ibuki T, Nishihara S, Mizuguchi H, Momota H, Kishibuchi R, Hashimoto T, Wada D, Kitagawa H, Watanabe TK. 2009. Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1. *Brain Research*, 1257:16-24.
- Saleh M, Mathison JC, Wolinski MK, Bensinger SJ, Fitzgerald P, Droin N, Ulevitch RJ, Green DR, Nicholson DW. 2006. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature*, 440 (7087):1064-1068.
- Sano R, Reed JC. 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833 (12):3460-3470.
- Schefold JC, Bierbrauer J, Weber-Carstens S. 2010. Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe

- sepsis and septic shock. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 1 (2):147-157.
- Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ. 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Molecular cell*, 7 (6):1165-1176.
- Schröder M, Kaufman RJ. 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569 (1-2):29-63.
- Schweickert WD, Hall J. 2007. ICU-Acquired Weakness. *Chest*, 131 (5):1541-1549.
- Seemann S, Zohles F, Lupp A. 2017. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *Journal of Biomedical Science*, 24 (1):1-17.
- Senft D, Ronai ZeA. 2015. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends in Biochemical Sciences*, 40 (3):141-148.
- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Developmental Cell*, 3 (1):99-111.
- Silva RM, Ries V, Oo TF, Yarygina O, Jackson-Lewis V, Ryu EJ, Lu PD, Marciniak SJ, Ron D, Przedborski S, Kholodilov N, Greene LA, Burke RE. 2005. CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism. *Journal of Neurochemistry*, 95 (4):974-986.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-d, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-I, Angus DC. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315 (8):801-810.
- Szczesna-Skorupa E, Chen C-D, Liu H, Kemper B. 2004. Gene Expression Changes Associated with the Endoplasmic Reticulum Stress Response Induced by Microsomal Cytochrome P450 Overproduction. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (14):13953-13961.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*, 7 (9):880-885.
- Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase / endoribonuclease ( Ire1p ) in mammalian cells. *Genes & Development*, 12:1812-1824.
- Trojaborg W. 2006. Electrophysiologic techniques in critical illness-associated weakness. *Journal of the Neurological Sciences*, 242 (1-2 SPEC. ISS.):83-85.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, NY)*, 287 (5453):664-666.
- van der Kooij MA, von der Mark EM, Kruijt JK, van Velzen A, van Berkel TJC, Morand OH. 1997. Human Monocyte Derived Macrophages Express an 120-kD Ox-LDL Binding Protein With Strong Identity to CD68. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17 (11):3107-3116.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn i, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman r. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR



- data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3 (711):34-31.
- Vary TC, Kimball SR. 1992. Sepsis-Induced Changes in Protein Synthesis: Differential Effects on Fast- and Slow-Twitch Muscles. *The American Journal of Physiology*, 262 (6):C1513-C1519.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*, 22 (7):707-710.
- von Loeffelholz C, Döcke S, Lock JF, Lieske S, Horn P, Kriebel J, Wahl S, Singmann P, de las Heras Gala T, Grallert H, Raschzok N, Sauer IM, Heller R, Jahreis G, Claus RA, Bauer M, Stockmann M, Birkenfeld AL, Pfeiffer AFH. 2017. Increased lipogenesis in spite of upregulated hepatic 5'AMP-activated protein kinase in human non-alcoholic fatty liver. *Hepatology Research*, 47 (9):890-901.
- Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. 1998. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO Journal*, 17 (19):5708-5717.
- Weber-Carstens S, Koch S, Spuler S, Spies CD, Bubser F, Wernecke KD, Deja M. 2009. Nonexcitable muscle membrane predicts intensive care unit-acquired paresis in mechanically ventilated, sedated patients. *Critical Care Medicine*, 37 (9):2632-2637.
- Weber-Carstens S, Deja M, Koch S, Spranger J, Bubser F, Wernecke KD, Spies CD, Spuler S, Keh D. 2010. Risk factors in critical illness myopathy during the early course of critical illness: a prospective observational study. *Crit Care*, 14 (3):R119-R119.
- Weber-Carstens S, Schneider J, Wollersheim T, Assmann A, Bierbrauer J, Marg A, Hasani HA, Chadt A, Wenzel K, Koch S, Fielitz J, Kleber C, Faust K, Mai K, Spies CD, Luft FC, Boschmann M, Spranger J, Spuler S. 2013. Critical illness myopathy and GLUT4 significance of insulin and muscle contraction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187 (4):387-396.
- Wei MC, Zong W-x, Cheng EH, Lindsten T, Ross AJ, Roth KA, Macgregor GR, Craig B, Korsmeyer SJ. 2001. Proapoptotic Bax and Bak: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*, 292 (5517):727-730.
- Weijs PJM, Stapel SN, De Groot SDW, Driessen RH, De Jong E, Girbes ARJ, Strack Van Schijndel RJM, Beishuizen A. 2012. Optimal protein and energy nutrition decreases mortality in mechanically ventilated, critically ill patients: A prospective observational cohort study. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36 (1):60-68.
- Wiseman RL, Haynes CM, Ron D. 2010. SnapShot: The Unfolded Protein Response. *Cell*, 140 (4):4-6.
- Witt NJ, Zochodne DW, Bolton CF, Grand'Maison F, Wells G, Young GB, Sibbald WJ. 1991. Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure. *Chest*, 99 (1):176-184.
- Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G. 1960. Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. *Pflügers Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 270 (4):399-412.
- Wollersheim T, Woehlecke J, Krebs M, Hamati J, Lodka D, Luther-Schroeder A, Langhans C, Haas K, Radtke T, Kleber C, Spies C, Labeit S, Schuelke M, Spuler S, Spranger J, Weber-Carstens S, Fielitz J. 2014. Dynamics of myosin

- degradation in intensive care unit-acquired weakness during severe critical illness. *Intensive Care Medicine*, 40 (4):528-539.
- Wu H, Ballantyne CM. 2017. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity Find the latest version : Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 127 (1):43-54.
- Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. 2004. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *Journal of Biochemistry*, 136 (3):343-350.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13:134-134.
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. 2001. Activation of Caspase-12, an Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2-dependent Mechanism in Response to the ER Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (17):13935-13940.
- Yoshida H. 2007. ER stress and diseases. *FEBS Journal*, 274 (3):630-658.
- Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. 1998. Identification of the cis -Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins. *the Journal of Biological Chemistry*, 273 (50):33741-33749.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107 (7):881-891.
- Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. 2003. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Developmental Cell*, 4 (2):265-271.
- Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. 2000. ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the cis-Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology*, 20 (18):6755-6767.
- Zhang B, Liu Y, Zhang JS, Zhang XH, Chen WJ, Yin XH, Qi YF. 2015. Cortistatin protects myocardium from endoplasmic reticulum stress induced apoptosis during sepsis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 406:40-48.
- Zinser E, Sperkagottlieb CDM, Fasch EV, Kohlwein SD, Paltauf F, Daum G. 1991. Phospholipid-Synthesis and Lipid-Composition of Subcellular Membranes in the Unicellular Eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 173 (6):2026-2034.
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development*, 12 (7):982-995.
- Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JFP, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB. 2000. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nature Medicine*, 6 (8):924-928.
- Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 162 (1):59-69.

## 8 Anhang

### 8.1 Anamnesebogen INSIGHT-Studie

#### Anamnesebogen INSIGHT-Studie

| <b><u>Prüfung von Ein- und Ausschlusskriterien</u></b> |   |
|--|---|
| <b><u>Einschlusskriterien:</u></b>                     |   |
| <input type="checkbox"/>                               | Schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme                |
| <input type="checkbox"/>                               | OP-Indikation für eine offene Laparatomie                     |
| <input type="checkbox"/>                               | Alter $\geq 18$ Jahre   |
| <b><u>Ausschlusskriterien:</u></b>                     |   |
| <input type="checkbox"/>                               | Typ 1 Diabetes mellitus                                       |
| <input type="checkbox"/>                               | Einnahme von Immunsuppressiva >3 Monate                       |
| <input type="checkbox"/>                               | Chemotherapie innerhalb der letzten 2 Monate                  |
| <input type="checkbox"/>                               | Aktive chron. rheumatoid-entzündliche Erkrankung              |
| <input type="checkbox"/>                               | Aktueller Drogenabusus  |
| <input type="checkbox"/>                               | Leberzirrhose   |
| <input type="checkbox"/>                               | vorbestehende chronische dialysepflichtige Niereninsuffizienz |
| <b>Diabetesgruppe:</b>                                 | <input type="checkbox"/> Sepsis/septisches Schockgeschehen    |
| <b>Kontrollgruppe:</b>                                 | <input type="checkbox"/> Sepsis/septisches Schockgeschehen    |
|  | <input type="checkbox"/> T2DM/MeSy                            |

## Anamnesebogen INSIGHT-Studie

|  |   |
|--|---|
| <b>Datum:</b> _____  | <b>Pseudonymisierung:</b> xxxx_x<br>x1=erster Buchstabe des Vornamens<br>x2= zweiter Buchstabe des Familiennamens<br>x3= zweite Ziffer des Geburtstages<br>x4= zweite Ziffer des Geburtsmonats<br>x5=Patientengruppe (K=Kontrolle, D=DM/MeSy, S=Sepsis) |
| <b>Gruppe:</b> _____   |   |
| <b><u>Allgemeine Patientendaten</u></b>                                    |   |
| Alter: _____   | Körpergröße [m]: _____  |
| Geschlecht: _____  | Gewicht [kg]: _____   |
| <input type="checkbox"/> bekannter Diabetes mellitus Typ II                |   |
| <b>Operationsindikation:</b>   |   |
| <input type="checkbox"/> Erhalt von Blutprodukten in den letzten 6 Monaten |   |
| <b><u>Kreislaufparameter</u></b>   |   |
| HF [1/min]: _____  | RR <sub>syst</sub> [mmHg]: _____  |
|  | RR <sub>diast</sub> [mmHg]: _____   |
| <b><u>Medikamenten und Krankheitsanamnese</u></b>                          |   |
| <b>aktuelle Medikamenteneinnahmen</b>                                      |   |
| 1.   | 11.   |
| 2.   | 12.   |
| 3.   | 13.   |
| 4.   | 14.   |
| 5.   | 15.   |
| 6.   | 16.   |
| 7.   | 17.   |
| 8.   | 18.   |
| 9.   | 19.   |
| 10.  | 20.   |

## Anamnesebogen INSIGHT-Studie

|   |  |          |          |          |          |          |         |         |          |          |          |         |        |          |          |          |         |
|---|--|----------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|---------|--------|----------|----------|----------|---------|
| <u>Pseudonym:</u>   |  |          |          |          |          |          |         |         |          |          |          |         |        |          |          |          |         |
| <b>aktuelle Erkrankungen</b><br>1.<br><br>2.<br><br>3.<br><br>4.<br><br>5.<br><br>6.<br><br>7.<br><br>8.<br><br>9.<br><br>10.   | <b>vorherige Erkrankungen</b><br>1.<br><br>2.<br><br>3.<br><br>4.<br><br>5.<br><br>6.<br><br>7.<br><br>8.<br><br>9.<br><br>10. |          |          |          |          |          |         |         |          |          |          |         |        |          |          |          |         |
| <b><u>Alkoholkonsum</u></b><br><br>Anzahl der konsumierten Drinks in der Woche: _____<br><br><small>Ein Drink entspricht einer Flasche Bier, einem Glas Wein oder einem Glas Schnaps (2cl)</small>  |  |          |          |          |          |          |         |         |          |          |          |         |        |          |          |          |         |
|   |  |          |          |          |          |          |         |         |          |          |          |         |        |          |          |          |         |
| <b><u>Taillenumfang[cm]:</u></b> _____  |  |          |          |          |          |          |         |         |          |          |          |         |        |          |          |          |         |
| <b><u>Hautfaltenmessung</u></b><br><br><table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%;">Trizeps:</td> <td style="width: 15%;">1. _____</td> <td style="width: 15%;">2. _____</td> <td style="width: 15%;">3. _____</td> <td style="width: 10%;">M _____</td> </tr> <tr> <td>Rücken:</td> <td>1. _____</td> <td>2. _____</td> <td>3. _____</td> <td>M _____</td> </tr> <tr> <td>Hüfte:</td> <td>1. _____</td> <td>2. _____</td> <td>3. _____</td> <td>M _____</td> </tr> </table> |  |          | Trizeps: | 1. _____ | 2. _____ | 3. _____ | M _____ | Rücken: | 1. _____ | 2. _____ | 3. _____ | M _____ | Hüfte: | 1. _____ | 2. _____ | 3. _____ | M _____ |
| Trizeps:  | 1. _____   | 2. _____ | 3. _____ | M _____  |          |          |         |         |          |          |          |         |        |          |          |          |         |
| Rücken:   | 1. _____   | 2. _____ | 3. _____ | M _____  |          |          |         |         |          |          |          |         |        |          |          |          |         |
| Hüfte:  | 1. _____   | 2. _____ | 3. _____ | M _____  |          |          |         |         |          |          |          |         |        |          |          |          |         |

## Anamnesebogen INSIGHT-Studie

| <b><u>Zusatzblatt für Sepsispatienten</u></b>  |   |
|--|---|
| <b><u>Pseudonym:</u></b>   |   |
| <b><u>Scores</u></b>   |   |
| <b>APACHE II</b>   | _____   |
| <b>SAPS II</b>   | _____   |
| <b>SOFA</b>  | <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>respiratorisch:</span> <span>_____</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <span>Nervensystem:</span> <span>_____</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <span>Kardiovaskulär:</span> <span>_____</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <span>Leber:</span> <span>_____</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <span>Gerinnung:</span> <span>_____</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <span>Niere:</span> <span>_____</span> </div> |
| Σ= _____   |   |
| <b><u>Infektionsfokus:</u></b>   |   |
| <input type="checkbox"/> Lunge<br><input type="checkbox"/> Knochen oder Weichgewebe<br><input type="checkbox"/> Urogenitaltrakt<br><input type="checkbox"/> Andere | <input type="checkbox"/> Abdomen<br><input type="checkbox"/> Operationswunde<br><input type="checkbox"/> Primäre Bakteriämie  |
| <b><u>Spezielle Therapieverfahren:</u></b>   |   |
| <input type="checkbox"/> Insulintherapie   |   |
| <b><u>Hämodynamik</u></b>  |   |
| Herzfrequenz [1/min]: _____  | MAP [mmHg]: _____   |
| ZVD [mmHg]: _____  | zentralvenöse O <sub>2</sub> Sättigung [%]: _____   |
| <b><u>Laborparameter:</u></b>  |   |
| Plasmaglukose: _____   | HbA1c [%Hb]: _____  |
| CRP: _____   | Serumkreatinin: _____   |
| Laktat: _____  |   |

### 9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Christian von Loeffelholz für die Möglichkeit, im Rahmen der von ihm geleiteten INSIGHT-Studie ein Promotionsthema zu entwickeln. Er war immer ansprechbar und hat mit seiner fachlichen Hilfe und stetigen Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die Betreuung der Promotion danke ich Herrn Prof. Ralf A. Claus. Er hat mich mit fachlichen und methodischen Ratschlägen sowie vielen konstruktiven Gesprächen im gesamten Zeitraum des Promotionsvorhabens umfassend unterstützt.

Herrn Dr. med. Paul Horn gilt mein Dank für die Probensammlung im ersten Jahr der INSIGHT-Studie und für seine Unterstützung und Anleitung bei den experimentellen Arbeiten und der statistischen Auswertung. Bei ihm und Herrn Ricardo Steidl möchte ich mich zudem für die Bereitstellung der murinem Muskelproben bedanken.

Außerdem danke ich Herrn PD Dr. med. Bernd Romeike und den MTAs des Arbeitsbereiches Neuropathologie für die Durchführung der CD68-Färbungen und die Beratung bei der Auswertung dieser Färbung.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. René Winkler und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Transkriptionsregulation des CMB für ihre Hilfestellung bei der Färbung von CHOP und CASP12 und für die durchgeführte Immunfluoreszenzmikroskopie.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der AG MMOF/Experimentelle Anästhesie für ihre Einarbeitung in die experimentelle Arbeit und fachlichen Anregungen, sowie das gute Arbeitsklima bedanken. Frau Brigitte Specht danke ich im Besonderen für ihre Hilfe und methodische Beratung bei allen histologischen Färbungen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner gesamten Familie. Durch ihr fortwährendes Interesse an meiner Promotion und ihre Unterstützung haben sie mich auch in schwierigen Situationen begleitet und damit zum Gelingen dieser Arbeit bedeutend beigetragen.

Bei meinem Mann Oliver und meinen Kindern Theresa und Gregor möchte ich mich ganz herzlich für ihre Unterstützung im gesamten Zeitraum der Promotion bedanken. Ihre stetige Hilfe und liebevolle Motivation haben mich immer begleitet und mir die Möglichkeit gegeben, das Promotionsvorhaben abschließen zu können.

## 10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- PD Dr. med. habil. Dipl. troph. Christian von Loeffelholz
- Prof Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Alexander Claus
- Dr. med. Paul Horn
- Dr. rer. nat. René Winkler

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 24.07.2019

Unterschrift der Verfasserin